



1859

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

## ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

### CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE *Fusarium-  
Trichoderma* EN BABACO (*Vasconcellea heilbornii* Badillo  
var. pentagona), MEDIANTE ESTUDIOS  
HISTOLOGICOS”

Tesis de grado previo a la  
obtención de título de  
Ingeniera Agrónomo

**AUTORA:** *Diana Lucia Rentería Jiménez*

**DIRECTOR:** *Ing. Ángel Rolando Robles Carrión M. Sc.*

LOJA-ECUADOR  
2015



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES**  
**RENOVABLES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**CERTIFICO:**

Que el trabajo de investigación de tesis: “**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE *Fusarium-Trichoderma* EN BABACO (*Vasconcellea heilbornii* Badillo. var. pentagona), MEDIANTE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS**”, de la autoría de la Señorita Diana Lucía Rentería Jiménez, Egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica, ha sido desarrollado bajo mi dirección, acorde con las actividades establecidas en el cronograma de ejecución del proyecto aprobado y sujetándose a la rigurosidad científica y las normas de redacción técnica.

Por lo expuesto autorizo a la Autora indicada, la presentación del documento de tesis respectivo para que continúe con los trámites legales de graduación.

Loja, 27 noviembre de 2015.

.....  
Ing. Ángel Robles Carrión M. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

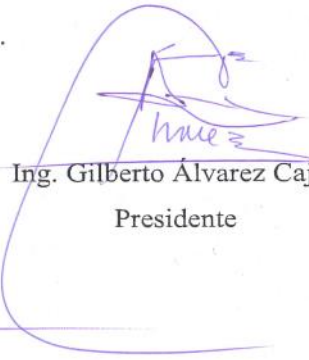
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

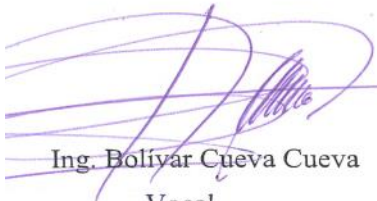
CERTIFICACIÓN


Una vez cumplida la reunión del tribunal de calificación del Trabajo Final de Tesis “ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE *Fusarium – Trichoderma* EN BABACO (*Vasconcellea heilbornii* Badillo var. *pentagona*), MEDIANTE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS” de la autoría de la Señorita DIANA LUCÍA RENTERÍA JIMÉNEZ, egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica, se le propuso realizar algunas correcciones de forma, mismas que han sido incluidas en el documento final.

En virtud, nos permitimos certificar el trabajo final consolidado de investigación está acorde a los requisitos de la carrera de Ingeniería Agronómica del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto se autoriza continuar con los trámites correspondientes.

Loja, 07 de diciembre del 2015.

  
Ing. Gilberto Álvarez Cajas  
Presidente

  
Ing. Bolívar Cueva Cueva  
Vocal

  
Ing. Kléver Chamba Caillagua  
Vocal



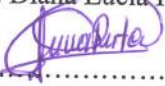
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**AUTORÍA**

Yo, Diana Lucía Rentería Jiménez, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional - Biblioteca Virtual.

**Autora:** Diana Lucía Rentería Jiménez

**Firma:**  .....

**Cédula:** 1105584823

**Fecha:** 09/12/2015

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DE LA AUTORA PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.**

Yo, Diana Lucía Rentería Jiménez, declaro ser autora de la tesis titulada “**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE *Fusarium-Trichoderma* EN BABACO (*Vasconcellea heilbornii* Badillo. var. *pentagona*), MEDIANTE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS**”, como requisito para optar al grado de: **Ingeniera Agrónomo**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las Redes de Información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 9 días del mes de diciembre de dos mil quince, firma el autor.

**Firma:**



.....

**Autora:**

Diana Lucia Rentería Jiménez

**Número de Cédula:**

1105584823

**Dirección:**

Loja, Barrio Esteban Godoy

**Correo electrónico:**

diana-renteria1991@hotmail.com

**Teléfono:**

2545098

**Celular:**

0981941440

**DATOS COMPLEMENTARIOS:**

**Director de Tesis:** Ing. Ángel Rolando Robles Carrión M.Sc.

**Tribunal de Grado:** Ing. Gilberto Álvarez Cajas. PRESIDENTE  
Ing. Bolívar Cueva Cueva. VOCAL  
Ing. Kléver Chamba Caillagua. VOCAL

## AGRADECIMIENTO

Al terminar esta investigación quiero dar las gracias a muchas personas que han intervenido directa o indirectamente en esta investigación, pues sin ellas no hubiese sido posible su finalización.

En especial al Ing. Ángel Robles Carrión M. Sc., en calidad de Director de tesis, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo el proyecto de tesis en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología y en el invernadero del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por el respaldo, orientación, amplios conocimientos y experiencia durante el transcurso del mismo.

A mis compañeros tesistas, Verónica Villa y Luis Medina, por su valioso apoyo, compañía y amistad incondicional.

A mi Carrera Ingeniería Agronómica, a sus docentes por los conocimientos y experiencias impartidas y adquiridas en todos los años de estudio que son de significancia en mi vida.

A todos aquellos que hicieron posible este objetivo.

*La Autora*

## DEDICATORIA

Con todo respeto y amor dedico este triunfo.

A Dios, por sus bendiciones e iluminar mi camino, darme la inteligencia y brindarme la fuerza necesaria, para poder lograr uno de mis grandes propósitos en mi vida profesional.

A mis padres Jorge Rentería y Martha Jiménez, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Por su comprensión, amor brindado, su ayuda en los momentos difíciles, y con los recursos necesarios para estudiar.

A mis hermanas Katty y Susana Rentería, por brindarme su apoyo, su cariño, sin ustedes no hubiese podido hacer realidad este sueño. ¡Gracias! por estar conmigo y apoyarme siempre, las quiero mucho.

*Diana L. Rentería Jiménez*

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINAS
PORTADA.....	i
CERTIFICACION.....	ii
APROBACIÓN.....	iii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
INDICE DE ECUACIONES.....	xiii
INDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. ORIGEN, EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL BABACO ( <i>Vasconcellea heilbornii</i> Badillo. var. <i>pentagona</i> ).....	4
2.1.1. Características Generales del Babaco.....	4
2.1.2. Condiciones edafoclimáticas.....	5
2.2. EL CULTIVO DEL BABACO EN EL ECUADOR.....	6
2.2.1. Propagación del Babaco.....	6
2.2.2. Principales Enfermedades del Babaco.....	7
2.3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.....	10
2.4. <i>Trichoderma</i> COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO.....	11
2.4.1. Clasificación taxonómica.....	12
2.4.2. Biología de <i>Trichoderma</i> .....	12
2.4.4. Características morfológicas.....	13
2.4.5. Mecanismos de acción.....	viii 13



2.5. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE <i>Trichoderma</i> EN INTERACCIÓN CON DIFERENTES PATÓGENOS EN CULTIVOS.....	16
<b>3. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. UBICACIÓN DEL PROYECTO.....	18
3.1.1. Ubicación Política.....	18
3.1.2. Ubicación Geográfica del invernadero .....	19
3.1.1. Ubicación ecológica.....	19
3.2. MATERIALES.....	19
3.2. METODOLOGÍA.....	20
3.3.1. EVALUAR LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (MVB) EN LA PROVINCIA DE LOJA.....	20
3.3.1.1. Determinación de los sitios de estudio.....	20
3.3.1.2. Determinación de la incidencia.....	22
3.3.1.3. Determinación de la severidad.....	22
3.3.2. DETERMINACIÓN DEL BIOCONTROL DE <i>Fusarium spp.</i> , EN INTERACCIÓN CON <i>Trichoderma spp.</i> , CAUSANTES DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (MVB), MEDIANTE PRUEBAS DE INOCULACIÓN BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.....	24
3.3.2.1. Aislados de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma spp.</i> .....	24
3.3.2.2. Material vegetal.....	25
3.3.2.3. Cultivo y multiplicación de los aislamientos de <i>Fusarium spp.</i> .....	25
3.3.2.4. Cultivo y multiplicación de los aislamientos de <i>Trichoderma spp.</i> .....	26
3.3.2.5. Preparación de la suspensión de esporas de <i>Fusarium spp.</i> , y <i>Trichoderma spp.</i>	26
3.3.2.6. Inoculación de raíces en plantas de Babaco, con <i>Fusarium spp.</i> , y <i>Trichoderma spp.</i> .....	27
3.3.2.7. Evaluación de la severidad de la enfermedad.....	28
3.3.3. REALIZAR ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LA INTERACCIÓN <i>Fusarium-Trichoderma-Babaco</i> EN DIFERENTES ESTADIOS DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA.....	29
3.3.3.1. Material vegetal.....	29
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>

4.1. EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (MVB) EN LA PROVINCIA DE LOJA.....	31
4.2. DETERMINACIÓN DEL BIOCONTROL DE <i>Fusarium spp.</i> , EN INTERACCIÓN CON <i>Trichoderma spp.</i> , CAUSANTES DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (MVB), MEDIANTE PRUEBAS DE INOCULACIÓN BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.....	33
4.3. REALIZACIÓN DE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LA INTERACCIÓN FUSARIUM-TRICHODERMA-BABACO EN DIFERENTES ESTADIOS DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA.....	34
4.3.1. Histología en plantas sanas de Babaco.....	34
4.3.2. Histología en plantas de Babaco con infecciones inducidas de <i>Fusarium oxysporum</i> (QUI2 y CHA1), bajo invernadero .....	36
4.3.3. Histología en plantas de Babaco con inoculaciones inducidas de <i>Trichoderma spp.</i> , (ECM6), bajo invernadero.....	40
4.3.4. Histología en plantas de Babaco con inoculaciones inducidas de <i>Trichoderma spp</i> (ECM6) y <i>Fusarium oxysporum</i> (QUI2 y CHA1), bajo invernadero.....	42
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>7. RECOMENDACIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁGINAS
<b>Cuadro 1.</b> Sectores donde se identificó la presencia de la MVB en provincia de Loja.....	21
<b>Cuadro 2.</b> Escala de evaluación de la severidad externa.....	23
<b>Cuadro 3.</b> Datos tomados en la evaluación de la incidencia y severidad de la Marchitez Vascular del Babaco.....	23
<b>Cuadro 4.</b> Caracterización morfo-cultural, molecular y patogénicamente de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Trichoderma spp.</i> .....	24
<b>Cuadro 5.</b> Actividades desarrolladas en la etapa de cuarenta.....	25
<b>Cuadro 6.</b> Distribución de los tratamientos en el invernadero.....	28
<b>Cuadro 7.</b> Escala de evaluación de la severidad externa .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINAS
<b>Figura 1.</b> Mapa de ubicación de la investigación.....	18
<b>Figura 2.</b> Ubicación de los sectores donde se identificó la presencia de la Marchitez Vascolar del Babaco en la provincia de Loja.....	21
<b>Figura 3.</b> Incidencia de la Marchitez Vascolar del Babaco en la provincia de Loja.....	31
<b>Figura 4.</b> Severidad de la Marchitez Vascolar del Babaco en la provincia de Loja.....	32
<b>Figura 5.</b> Severidad de los tratamientos con dos cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> y una cepa de <i>Trichoderma</i> spp., en la severidad de la Marchitez Vascolar en el invernadero AARNR.....	33
<b>Figura 6.</b> Tejidos sanos de la base y cuello de una raíz en Babaco.....	34
<b>Figura 7.</b> Tejidos infectados con <i>Fusarium oxysporum</i> (patogenicidad alta).....	36
<b>Figura 8.</b> Tejidos infectados con <i>Fusarium oxysporum</i> (patogenicidad baja).....	38
<b>Figura 9.</b> Tejidos infectados con <i>Trichoderma</i> spp.....	40
<b>Figura 10.</b> Tejidos inoculados con <i>Fusarium oxysporum</i> (patogenicidad alta)+ <i>Trichoderma</i> spp.....	42
<b>Figura 10.</b> Tejidos inoculados con <i>Fusarium oxysporum</i> (patogenicidad baja) + <i>Trichoderma</i> spp.....	44

## ÍNDICE DE ECUACIONES

CONTENIDO	PÁGINAS
<b>Ecuación 1.1.</b> Determinación de la incidencia.....	22
<b>Ecuación 1.2.</b> Determinación de la severidad.....	22
<b>Ecuación 1.3.</b> Conteo de la cantidad de conidios.....	26
<b>Ecuación 1.4.</b> Concentración de esporas $1 \times 10^6$ por $\text{ml}^{-1}$ para UFC.....	27
<b>Ecuación 1.5.</b> Evaluación de la severidad de la enfermedad.....	29

## ÍNDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	PÁGINAS
<b>Anexo 1.</b> Grados de escala de severidad externa de la Marchitez Vascular del Babaco.....	64
<b>Anexo 2.</b> Conteo de estructuras conidiales de las cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Trichoderma</i> spp.....	65
<b>Anexo 3.</b> Evaluación de la Incidencia y Severidad de la Marchitez Vascular del Babaco, en la provincia de Loja.....	68
<b>Anexo 4.</b> Datos tomados de la Severidad de la enfermedad en el invernadero.	69
<b>Anexo 5.</b> Análisis estadístico según Tukey 5% en el efecto de severidad de la enfermedad en los tratamientos T1, T2, T4 y T5, en plantas de Babaco, bajo condiciones de invernadero. Loja. 2015.....	68
<b>Anexo 6.</b> Fotografías.....	71
<b>Anexo 6.1.</b> Evaluación de la incidencia y severidad de la MVB en la finca de la Sra. Rosa Gálvez sector El Carmelo.....	71
<b>Anexo 6.2.</b> Montaje del diseño experimental completamente al azar, en el invernadero.....	71
<b>Anexo 6.3.</b> Cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> QUI2 y CHA1.....	72
<b>Anexo 6.4.</b> Cepa de <i>Trichoderma</i> spp.....	72
<b>Anexo 6.5.</b> Inoculación de las raíces en plantas de Babaco con el hongo fitopatógeno mas el hongo biocontrolador.....	72
<b>Anexo 6.6.</b> Base del cuello de la raíz de la planta de Babaco inoculado con <i>Fusarium oxysporum</i> QUI2.....	72
<b>Anexo 6.7.</b> Cortes transversales de la base del cuello de la raíz de 10 um de grosor.....	73
<b>Anexo 6.8.</b> Observaciones histológicas de los cortes realizados en el microscopio óptico OLYMPUS.....	73

**“ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE *Fusarium-Trichoderma* EN BABACO (*Vasconcellea heilbornii* Badillo. var. pentagona), MEDIANTE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS”**

## RESUMEN

En la actualidad, la actividad agrícola en el Ecuador tiene mucha importancia y trascendencia, que se proyecta muy fuertemente, marcando índices y pautas en nuestra economía. En este contexto, se destaca el auge que existe en la producción de cultivos agrícolas no tradicionales y ancestrales, uno de los cuales es el Babaco. Esta planta nativa del Sur del Ecuador, considerado desde épocas pasadas como una fruta de óptimas características ya que posee ventajas como el no poseer semillas, tener una cáscara delgada y el agradable sabor de su pulpa. Existe una amplia gama de agentes fitopatógenos que se relacionan con el cultivo del Babaco en sus diferentes etapas vegetativas y reproductivas; dentro de las cuales se encuentra la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) causada por *Fusarium* spp., la cual puede causar pérdidas hasta el 100% en pocas semanas si no toman medidas de control adecuadas para mitigar la severidad de la enfermedad. Este trabajo de investigación se realizó con el fin de evaluar la interacción entre *Fusarium-Trichoderma* en Babaco (*Vasconcellea heilbornii* Badillo. var. pentagona), mediante estudios histológicos. Se utilizaron dos aislados de *Fusarium* causantes MVB y un aislado de *Trichoderma*, todos los microorganismos objeto de estudio fueron caracterizados morfo-cultural, molecular y patogénicamente en estudios anteriores. Por esta razón, 42 plantas de Babaco de 60 días de edad se las sometieron a infecciones inducidas en seis tratamientos, se evaluó la severidad de cada uno de los tratamientos por un periodo de 40 días, seleccionando los tratamientos: T1, T2, T4 y T5. Los resultados sugieren que la incidencia de la MVB, en la provincia de Loja se encuentra en un rango comprendido de 66,7 al 100%. La cepa de *Trichoderma* spp., mostró gran capacidad antagonica frente a las dos cepas de *Fusarium* sp., reduciendo su severidad en un rango comprendido de 3,6 a 10,7% en el último periodo de evaluación. Los estudios histológicos con infecciones inducidas por *Fusarium* (cepa QUI2), se observaron las hifas del patógeno (color azul) colonizando y obstruyendo los haces vasculares, para la cepa CHA1, se observaron la plasmólisis de las células parenquimatosas del xilema y la desorganización celular por efectos del microorganismo patogénico.

**Palabras claves:** *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., interacción, severidad, biocontrol, estudios histológicos.



## ABSTRACT

This broad biodiversity projects in farming and food security as key activities within the national economy. In this context, there is the rise in the production of exotic and ancient agricultural crops, one of which is the Babaco stands out. This native plant of southern Ecuador has great potential as arable species. A wide range of phytopathogenic fungi that relate Babaco cultivation in different vegetative and reproductive stages; among which is the disease of Vascular Wilt Babaco (MVB) caused by *Fusarium spp.*, this disease can cause losses up to 100% in a few weeks if they take adequate control measures to mitigate the severity of the disease. This research was conducted in order to evaluate the interaction between *Fusarium-Trichoderma* in Babaco (*Vasconcellea heilbornii* Badillo. var. pentagona), by histological studies. We used two *Fusarium* isolates causing MVB and *Trichoderma* isolate all the organisms under study were characterized morphologically, cultural and pathogenically in previous studies. For this reason, 42 Babaco plants 60 days old are subjected to the induced infections in six treatments. Then the severity of each treatment for 40-day period was evaluated. *F. oxysporum*, *Trichoderma spp* and interaction *Trichoderma* and *Fusarium*-control treatment: Later treatments were selected T1, T2, T3 and T4. The results suggest that the incidence of Vascular Wilt Babaco (MVB) in the province of Loja lies in a range of 66.7 to 100%. The antagonistic *Trichoderma spp.*, Showed great antagonistic capacity against the two strains of *Fusarium sp.*, Reducing its severity in a range from 3.6 to 10.7% at the last evaluation period. Histological studies with induced *Fusarium* (strain QUI2) infections, hyphae of the pathogen (blue) are observed colonizing and obstructing the vascular bundles, the xilémicos and parenchymal vessels also the presence and processes hypertrophy and hyperplasia was observed. In the CHA1 strain, plasmólisis of xylem parenchyma cells and cell disorganization effects of observed pathogenic microorganism.

**Keywords:** *Fusarium spp*, *Trichoderma spp*, interaction, severity, biocontrol, histological studies

# 1. INTRODUCCIÓN

Las especies de *Vasconcellea*, como la mayoría de los miembros de la familia *Caricaceae*, tienen su origen en el Sur y Centro América (Badillo, 1983). Dentro de este género se encuentra la especie *Vasconcellea heilbornii* "Babaco" que es actualmente la más importante de las *Vasconcellea*. Scheldeman (2002), considera a esta fruta como un híbrido natural proveniente de la cruce de dos especies *Vasconcellea stipulata* (Toronche) y *Vasconcellea pubescens* (Chamburo) y su origen radica en los valles de la provincia de Loja.

El Babaco en Ecuador desde el punto de vista económico y alimenticio, tiene un gran potencial como especie cultivable. Las demandas del mercado local e internacional son considerables por lo que existe un alto interés en la producción de esta fruta en el Ecuador (Andrade y Vivanco, 2002). El Babaco es considerado desde épocas pasadas como una fruta de óptimas características ya que posee ventajas como el no poseer semillas, tener una cáscara delgada y el agradable sabor de su pulpa, además contiene una enzima digestiva llamada papaína que facilita el desdoblamiento de la proteína animal, ayudando al sistema digestivo (Bravo, 2005; Uzcátegui, 2007).

En nuestro país los principales sistemas de cultivo de Babaco son en invernadero como a campo abierto, siendo las provincias más representativas de producción las de: Imbabura (Atuntaqui, Perucho); Tungurahua (Patate y Baños); Pichincha (Tumbaco); Azuay (Gualaceo, Santa Isabel); y Loja (Ampuero, 2004). La producción de esta fruta ha crecido favorablemente y según datos del Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca (MAGAP), se calcula que la superficie sembrada puede llegar de 150 a 200 ha, representados en su mayoría por cultivos bajo invernadero (Núñez, 2008).

Desde 1996 se registra un crecimiento acelerado de las ventas de Babaco al mercado exterior (Uzcátegui, 2007; Tobar, 2008) y después de casi 10 años de grandes réditos económicos obtenidos por la comercialización, se observó una estrepitosa caída en la producción de esta fruta, debido a la presencia de la enfermedad conocida como "La Marchitez Vascular del Babaco (MVB)" causada por el hongo *Fusarium oxysporum* reportada por primera vez por Ochoa y Fonseca (2000). Esta enfermedad se diseminó

rápidamente a lo largo y ancho del territorio ecuatoriano, llegando a destruir la totalidad del cultivo, trayendo consigo que muchos agricultores optaran por no seguir con el cultivo (Tobar, 2008).

Hasta el momento se pensaba que *Fusarium oxysporum* era el único causante de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) como lo reportado por Ochoa y Fonseca (2000). Sin embargo *Fusarium* spp., es uno de los géneros de microorganismos fitopatógenos más importantes por las severas pérdidas económicas que producen en diferentes cultivos (Burgess y Bryden, 2012). Sus más de 100 formas especiales (*formae speciales*) estudiadas hasta el momento producen marchitamientos en más de 100 tipos de cultivos, así lo atestiguan las miles de publicaciones científicas dedicadas al estudio de este género (Garcés de la Granada *et al.*, 2001; Burgess y Bryden, 2012). Por lo tanto diversos estudios llevados a cabo en la Universidad Nacional de Loja - Ecuador, demuestran la existencia de un complejo fitopatológico entre diversas especies del género *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium camptoceras*, y *Fusarium temperatum* asociadas a la enfermedad de la MVB y su patogenicidad ha sido comprobada en estudios de infección artificial en invernadero (Robles *et al.*, 2014; Gómez y Macas, 2014).

Uno de los principales métodos de control de la MVB, es mediante la utilización extensiva de los agroquímicos, repercutiendo directamente al deterioro del medio ambiente, y de la salud de los productores y consumidores, es por ello que se han promovido la búsqueda de alternativas viables que garanticen una mayor sostenibilidad en la producción agrícola, minimizando el impacto sobre el medio ambiente (Cueva, 2007). Frente a esta problemática una alternativa al uso de los agroquímicos en el control de las enfermedades de las plantas es mediante el control biológico, utilizando microorganismos como agentes de control.

El hongo *Trichoderma* spp., es un eficiente controlador biológico que está siendo ampliamente usado en agricultura como agente de biocontrol debido a su habilidad para colonizar sustratos rápidamente, inducir resistencia sistémica adquirida en plantas, promover el crecimiento vegetal y poseer actividad antagonista contra un amplio rango de hongos patógenos. El efecto inhibitorio de sus antibióticos y la degradación de componentes de la pared celular de patógenos de plantas, es citado como aspecto importante de su actividad antagonista (Chaverri y Samuels, 2003; Ezziyyani *et al.*, 2004).

Bajo esta premisa y dada la importancia económica que tiene el Babaco en la producción y exportación como fruta no tradicional, es necesario las diferentes interacciones entre *Fusarium-Trichoderma* en plantas de Babaco, mediante estudios histológicos y los resultados de esta investigación ayudarán en la obtención de información del modo de acción que ejerce este biocontrolador sobre las especies patogénicas causantes de la MVB.

Los objetivos planteados en este estudio fueron:

- Evaluar la incidencia y severidad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) en la provincia de Loja.
- Determinar el biocontrol de *Fusarium* spp., en interacción con *Trichoderma* spp., causantes de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante pruebas de inoculación bajo condiciones controladas.
- Realizar estudios histológicos de la interacción *Fusarium-Trichoderma-Babaco* en diferentes estadios de crecimiento de la planta.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ORIGEN, EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii* Badillo var. *pentagona*)

El Ecuador es un país conocido por su riqueza biológica, debido a una amplia variabilidad de climas desde el polar hasta el tropical, además posee diferentes zonas ecológicas, que van desde desierto hasta selva tropical, desde el punto de vista de diversidad biológica, nuestro país se encuentra entre los países con más biodiversidad por unidad de superficie en el mundo (Kyndt, 2005).

La amplia biodiversidad en cultivos agrícolas incluyendo a sus ancestros, encontrados en forma silvestre en el Ecuador, hace que nuestro país ofrezca posibilidades únicas para el cultivo de especies no tradicionales como el Babaco cultivo de amplia aceptación en el mercado internacional (Kyndt, 2005; Uzcátegui, 2007).

De acuerdo a clasificación más reciente realizada por Badillo (1997, 2001), afirma que la especie del género *Vasconcellea heilbornii*, es un híbrido natural partenocarpio (que no posee semillas) y es el resultado de la hibridación interespecífica de las especies *Vasconllea stipulata* (Toronche) y *Vasconcellea pubescens* (Chamburo), cuyo centro de origen radica en los valles interandinos de la provincia de Loja (Scheldeman, 2002).

#### 2.1.1. Características Generales del Babaco

**Raíz.** Cuando la planta es joven (provenientes de estacas) presenta raíces de color café claro, de consistencia muy delgada (se quiebra con facilidad), al romperse exuda látex pegajoso. Después del trasplante, el sistema radicular demora en desarrollarse; luego se forman las raíces de consistencia carnosa y logran poca profundidad (un metro, o menos). Las raíces secundarias son largas, de 50 a 60 cm de longitud. Las raíces terciarias son de mayor proporción y ramificadas, un poco más, débiles, quebradizas y tienen gran capacidad de retención de agua (AAIC, 2003).

**Tallo.** Posee un tallo erecto no leñoso y cilíndrico de color verde cuando es joven y marrón-grisáceo cuando la planta es adulta, además en el tallo presenta cicatrices foliares

típicas similares al de otras caricáceas, raramente presenta ramificaciones pero brotes a menudo aparecen alrededor de la base (Asturizaga *et al.*, 2006; Jácome, 2011).

**Hojas.** Son grandes en estado adulto, pueden llegar a medir hasta los 60 – 80 cm; son de color verde, limbo lobulado con cinco lóbulos (palmolobulares), el haz es verde oscuro mientras que el envés es verde claro; poseen nervaduras bien marcadas muy sensibles. Además poseen un largo peciolo que puede medir 30 cm (AAIC, 2003; Asturizaga *et al.*, 2006; Jácome, 2011).

**Flores.** Se forman sobre el tronco recientemente desarrollado durante la fase de crecimiento de la planta, todas son femeninas y usualmente solitarias sobre el final de un largo tallo péndulo que se desarrolla en cada axila foliar (Asturizaga *et al.*, 2006). Los pétalos son de color blanco-amarillento-verdoso y sópalos verde-oscuros (Jácome, 2011).

**Frutos.** Son bayas elipsoidales de color amarillo cuando ha llegado a la maduración completa, no necesitan polinización para desarrollarse, son partenocárpicas y no presenta semillas, es alargado de sección pentagonal, de unos 30 cm de largo y de 6 a 12 cm de diámetro (Asturizaga *et al.*, 2006). Cada fruto puede llegar a pesar entre 300 g y 2 kg, cada planta puede llegar a producir has 50 kg por metro cuadrado. Su pulpa es blanca, muy jugosa, ligeramente ácida cuando madura y baja en azúcar (Jácome, 2011).

Los frutos del Babaco tienen un sabor y aroma diferente al de la papaya común (Uzcátegui, 2007). Este sabor distintivo ha sido descrito por tener matices de sabor a naranja, frutilla, piña y papaya. El Babaco es principalmente usado en el Ecuador en la preparación de jugos, almibares y es extensamente usado en cocina para preparar dulces, salsas y una variedad de postres (Ampuero, 2004).

### **2.1.2. Condiciones edafoclimáticas**

La altitud ideal para su óptima producción es de 1800 a 2400 msnm (Fabara *et al.*, 1985). La temperatura ideal para el desarrollo y fructificación del Babaco es 15 – 20° C, por lo que no tolera temperaturas muy extremas ya sean inferiores a 14 o superiores a 27° C (Caguana, 2003; Jácome, 2011). La precipitación promedio anual ideal para el cultivo oscila en un rango de 600 a 1500 mm/año (Fabara *et al.*, 1985; Jácome, 2011). El porcentaje de

humedad relativa esta alrededor del 60 al 80% y un porcentaje de luminosidad de 4.5 a 5 horas por día (Caguana, 2003; Jácome, 2011).

El tipo de suelo ideal para el Babaco varían de franco, franco-arcillo-limoso y franco-arcillo-arenoso, con una capa arable de 0.80 cm y con bastante materia orgánica (3%), pH ideal de 7.1 (puede soportar de 5.8 a 8.2 pH); a fin de facilitar su aireación, su drenaje y evitar el ataque de enfermedades radiculares (Fabara *et al.*, 1985; Caguana, 2003).

## **2.2. EL CULTIVO DEL BABACO EN EL ECUADOR**

El Babaco produce de 25 a 45 frutos/planta /año, lo que con una densidad de 2500 plantas por hectárea produce entre 50 y 80 toneladas por año (Jácome 2011).

El Babaco en la actualidad se cultiva en regiones de la sierra ecuatoriana en las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Azuay y Loja en altitudes de 1500 a 3000 msnm y una temperatura que varía de 13 a 22°C, estos lugares constituyen las provincias más representativas en la producción de esta fruta (Ampuero, 2004). Scheldeman (2002), afirma que la altitud ideal para la producción del Babaco está entre 1800 a 2400 msnm, además asevera que el principal factor para este cultivo son las bajas temperaturas conocidas como heladas. La producción de esta fruta ha crecido favorablemente y según datos reportados por INIAP, se ha calculado que la superficie sembrada de Babaco puede llegar de 150 a 200 ha, representados en su mayoría por cultivos bajo invernadero (Núñez, 2008).

### **2.2.1. Propagación del Babaco**

El Babaco al no poseer semillas, su propagación se la hace por vía asexual o vegetativa. Los métodos de propagación más usados son: por estacas y por injertación. El primero consiste en emplear estacas de plantas maduras de 20 a 25 cm, con diámetro de 4 a 6 cm (Caguana, 2003; Jácome, 2011). Deben tener un corte diagonal (bisel) en la parte superior para evitar que el agua de riego o lluvia se acumule y un corte transversal en la parte inferior para tener una mayor superficie de enraizamiento (Caguana, 2003). Luego de realizar los cortes es aconsejable agregar una hormona de crecimiento o agua azucarada (Caguana, 2003; Jácome, 2011). Este material debe permanecer durante 8 días bajo sombra, tiempo para que se cicatricen las heridas, seguidamente, las estacas se desinfectan con un

fungicida para evitar el ataque de hongos *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*, se procede a la siembra en bolsas con un sustrato que permita la aireación (Caguana, 2003).

El segundo método de propagación más usado en el Babaco, es por injertación. El tipo de injerto más usual es de púa terminal o asa terminal, esta técnica que consiste en podar el patrón a una altura de 10 cm, generalmente se usa especies de *Vasconcellea cundimarcensis* y *Vasconcellea stipulata*. Seguidamente se realiza una hendidura diametral longitudinal en la que se injerta el Babaco, con un brote tierno del mismo diámetro que el patrón. Después, se cubre con una cinta plástica especial de buena elasticidad, esto se realiza con el objetivo de favorecer la unión con el patrón y evitar la entrada de microorganismos fitopatógenos. Finalmente, se cubre el material injertado con una bolsa plástica para mantener la temperatura y acelerar la brotación (Fabara *et al.*, 1985; Caguana, 2003).

### **2.2.2. Principales Enfermedades del Babaco**

Las enfermedades de las plantas pueden ser ocasionadas por cualquier microorganismo fitopatógeno, ya sean hongos, bacterias, virus, nematodos y actinomicetos (Agrios, 2005). Las cuales son el resultado de la interacción dinámica de tres factores: el microorganismo fitopatógeno presente en el patosistema, al cual le corresponde la dinámica ecológica de los suelos en cuanto a la diversidad y a la regulación poblacional. La condición del hospedante susceptible, teniendo en cuenta sus etapas fenológica y metabólica, además el medio ambiente especialmente referido a las condiciones edafoclimáticas en las cuales se establecen los cultivos (Guzmán-Piedrahita *et al.*, 2009; Robles, 2011).

### **2.2.3. Enfermedades fúngicas**

Los hongos son microorganismos filamentosos simples. No tienen clorofila y dependen de una planta hospedera para obtener su alimento. Algunas especies y géneros presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos globalmente (Ampuero, 2004). Los hongos ocasionan severos daños en los agroecosistemas del mundo y son los responsables de una baja producción y calidad de alimentos para el consumo humano (Guzmán-Piedrahita *et al.*, 2009). Es así que las enfermedades de origen fúngico son responsables de las mayores pérdidas reportadas en diferentes cultivos, entre ellos el Babaco (Caguana, 2003; Ampuero, 2004).



**La Enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB).** Llamada también traqueomicosis o traqueobacteriosis, se la define como un complejo de trastornos vasculares que causan un estado general de la planta que casi siempre termina con la muerte de la misma. Además, las enfermedades vasculares se producen por la invasión del fitoparásito en el sistema vascular de las plantas (xilema y floema), los cuales provocan necrosis de las células que conforman los tejidos conductores; la necrosis es originada por la acción directa del fitoparásito o por las toxinas que este libera. Algunas veces la marchitez ocasiona la obstrucción de los vasos cribosos del xilema, lo que impide la normal circulación de agua y nutrientes (Agrios, 2005).

Los primeros síntomas que aparecen en las plantas debido a los marchitamientos vasculares son las afectaciones en el sistema vascular de la planta, en la cual se puede observar la pérdida de turgencia en la célula, seguido de clorosis, decaimiento general de la planta y finalmente la muerte. Según la naturaleza del fitoparásito se consideran dos tipos de marchitez vascular en plantas: la traqueobacteriosis, causadas por bacterias y la traqueomicosis, por hongos (Agrios, 2005). Como ejemplo de cada una de ellas podemos citar la traqueobacteriosis del maíz, conocida como marchitez bacteriana o enfermedad de Stewart y la traqueomicosis del Babaco, conocida como la Marchitez Vascular del Babaco (MVB).

Bajo estos antecedentes, la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), se origina en los años de 1990 con el auge en la producción y exportación del Babaco hacia mercados internacionales. En el año de 1996 se observaron la presencia de una enfermedad que atacaba al sistema radicular del Babaco en invernaderos de la sierra centro del país; esta enfermedad produjo la reducción del cultivo en un 100 %. Acabo de corto tiempo esta enfermedad se diseminó a lo largo y ancho del país debido principalmente al intercambio del material vegetativo entre las diversas zonas productoras del país, al desconocimiento total del microorganismo que ocasionaba la MVB, a la falta de estrategias de control de dicha enfermedad y a la forma de propagación del Babaco (por estacas e injertos) (Ochoa *et al.*, 2000; Tobar, 2008).

En el año 1999 la MVB pasó de ser una enfermedad en aisladas zonas productoras de Babaco a ser una epifitía de grandes dimensiones que ocasionaba la destrucción total de las

plantaciones en todo el Ecuador. Es así que investigadores del INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias), comenzaron a indagar sobre las condiciones en que se desarrollaba la enfermedad de la MVB y a descubrir el microorganismo causante de la enfermedad (Ochoa y Fonseca, 2000).

En el año 2000, los investigadores del INIAP, Ochoa y Fonseca, lograron aislar y caracterizar morfológicamente el microorganismo causante de la MVB, designándole el nombre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*, los mismos investigadores en el año 2004 cambian el nombre del microorganismo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasconcellae*, debido a que los taxónomos reorganizaron el nombre del Babaco que anteriormente se llamaba *Carica heilbornii* var. *pentagona* en *Vasconcella heilbornii* var. *pentagona* (Badillo, 2001; O'Brien, 2010; Argotti *et al.*, 2011).

El agente causal de la MVB, son hongos pertenecientes al género *Fusarium*, este es un grupo de hongos filamentosos cosmopolitas ampliamente distribuidos, naturalmente se lo encuentra en el suelo y en ocasiones puede estar asociado a las pudriciones de raíces y tallos en muchas plantas cultivadas (Leslie and Summerell, 2006). Muchas especies del género *Fusarium* son saprofitas en algunas fases de su crecimiento y patógenas de cultivos en otras fases (Alexopoulos y Mims, 1996). Un gran número de especies han sido descritas dentro del género *Fusarium* por diversos autores, sin embargo 70 especies son consideradas por Leslie y Summerell (2006).

Los mecanismos de infección de *Fusarium* empiezan cuando los tubos germinales de las esporas y la germinación de las clamidosporas presentes en restos de cosechas anteriores o el micelio existente en el suelo, penetran por la raíz o por alguna herida al nivel de las raíces de las plantas, extendiéndose dentro de la corteza de la raíz, a la endodermis y llegando a los vasos xilémicos, a través de ellos asciendo por toda la planta, el micelio se multiplica y produce sus primeras estructuras reproductivas (microconidios), los que causan la obstrucción de los vasos, dando como resultado una alteración en el volumen del agua disponible para las hojas y el funcionamiento de toda la planta, esto trae consigo el cierre de los estomas, las hojas se marchitan y finalmente la planta muere (Agrios, 2005).

En la absorción de agua y nutrientes necesarios para completar su ciclo vital. Cuando el ataque es severo estos abultamientos puede comprometer al resto de las raíces próximas al cuello de la planta, esta se vuelve débil y finalmente muere (Agrios, 2005).

### **2.3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD**

Las pruebas de patogenicidad están muy relacionadas con los cuatro postulados de postulados de Koch vigentes en todos los campos de aplicación de la biología. El primer enunciado refleja la necesidad de la asociación constante de un agente biótico causante de la enfermedad con un hospedero susceptible; el segundo postulado se refiere al aislamiento in vitro del microorganismo en ausencia de otros (cultivo axénico), su caracterización. El tercer postulado describe la inoculación en un hospedero sano, es decir el microorganismo debe desencadenar el mismo cuadro patológico inicial (debe reproducir los mismos síntomas); finalmente el cuarto postulado indica que los dos aislamientos (el natural y el cultivado) deben coincidir su características morfológicas, culturales y biológicas (Volcy, 2008). Esta metodología consiste en la preparación de una solución de esporas en una concentración de  $1 \times 10^6$ . Posteriormente se inocula la solución en plantas sanas bajo condiciones controladas. Asimismo se lleva un registro de la sintomatología que se presenta en la planta, para luego comprobar el agente causal mediante estudios de laboratorio (Sarango y Palta, 2011).

Las pruebas de patogenicidad también permiten determinar cuál es la variabilidad patogénica de un agente causal dado y evaluar posibles fuentes de resistencia. *Fusarium oxysporum* formae speciales difieren en sintomatología, epidemiología y susceptibilidad de cultivares y puede ser distinguido por pruebas de patogenicidad con hospederos apropiados (Cueva, 2007).

Según estudios realizados por Ortiz (2012), revela a *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* como el agente causal de la marchitez por Fusarium en las pasifloráceas. De acuerdo a los estudios realizados por Cueva (2007) citado por Ochoa y Fonseca (1998), sobre Producción de inoculantes a base de *Trichoderma spp.* , para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae* en injertos de babaco al comparar con los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* sobre plantas de babaco se confirma

que la cepa de *Fusarium oxysporum* f sp *caricae* es patogénica y los síntomas registrados corresponden a la infección causada por el patógeno sobre el hospedero.

#### **2.4. TRICHODERMA COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO**

Las especies de *Trichoderma* tienen una gran actividad antagonista sobre patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium ultimum* y *Fusarium oxysporum*, causantes de enfermedades importantes en cultivos de rábano, clavel, crisantemo, fríjol, cafeto, haba, tomate, cítricos, vasconcelleas entre otros. Durante los últimos años, varios investigadores y algunas empresas han mostrado gran interés en estudiar el potencial de *Trichoderma* como controlador biológico de patógenos de suelo (Tobar, 2008).

Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. No obstante, se han realizado pocos estudios acerca de la sobrevivencia, establecimiento y proliferación de este antagonista en la rizósfera de la planta (Martínez *et al.*, 2013).

El principal beneficio de *Trichoderma* para la agricultura es el antagonismo con microorganismos patógenos de las plantas por su capacidad para producir secreciones enzimáticas tóxicas extracelulares que causan desintegración y muerte en hongos fitopatógenos que habitan el suelo (micoparasitismo), en la degradación de paredes celulares de las hifas de hongos patogénicos (depredación), en la producción de químicos volátiles y antibióticos antifungales que inhiben hongos basidiomicetos (amensalismo), en la colonización directa del hongo por penetración hifal (predación), en la competencia por oxígeno, nutrientes y espacio en el suelo y por su gran adaptabilidad y rápido crecimiento (Villegas, 2005).

Las cepas más utilizadas como agentes de control biológico en agricultura pertenecen a cuatro especies: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviridae*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma asperellum* (Tobar, 2008).

La mayor parte de especies conocidas del género *Trichoderma* están raramente asociadas con enfermedades en plantas, sin embargo cepas *Trichoderma aggressivum*, ataca a hongos

de cultivos comerciales como *Agaricus* y *Pleurotus*, en este caso es considerado un patógeno (Galarza, 2011).

#### **2.4.1. Clasificación taxonómica**

Según Agrios (2005), *Trichoderma* se clasifica en las siguientes categorías:

**Reino:** Mycetae

**División:** Eumycota

**Subdivisión:** Ascomycotina

**Clase:** Euascomycetes

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Hypocraceae

**Género:** *Trichoderma*

**Especie:** *Trichoderma aethiopicu*, *Trichoderma capillare*, *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma effusum*, *Trichoderma flagellatu*, *Trichoderma ghanense*, *Trichoderma gillesii*, *Trichoderma gracile*, *Trichoderma konilangbra*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma parareesei*, *Trichoderma pinnatum*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma saturnisporopsis*, *Trichoderma saturnisporum*, *Trichoderma sinense*, *Trichoderma solani* (Samuels *et al.*, 2012).

#### **2.4.2. Biología de *Trichoderma***

*Trichoderma* es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios tales como madera decadente (Martínez *et al.*, 2013). Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta en diferentes de zonas y hábitats, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Poveda, 2013). Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad

de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos (Galarza, 2011).

Las especies de *Trichoderma* han logrado adaptarse a todas las clases de hábitats y climas, haciendo de ellos unos de los hongos más versátiles del mundo. El rol de una sobrepoblación dominante dentro del sistema microbiano del suelo, podría ser probablemente el por qué este hongo posee una capacidad de adaptación metabólica flexible lo que le confiere su naturaleza competitiva y agresiva (Galarza, 2011).

#### **2.4.3. Características morfológicas**

*Trichoderma* forma colonias de color blanco a verde intenso que crecen rápidamente en medios de cultivo artificiales, el color varía debido a la pigmentación de las esporas, son flocosas y suaves. Las colonias pueden ser compactas o sueltas, la esporulación en la mayoría de las especies del género *Trichoderma*, es favorecida por su fotosensibilidad y como consecuencia de esto esporulan bien en varios sustratos, ya sean naturales o artificiales (Cueva, 2007).

Las características del género son: conidióforo hialino muy ramificado no verticilado, fiálides individuales o en grupos, conidios hialinos de una célula, ovoides, nacidos en pequeños racimos terminales. Asimismo, tiene conidios de globoso a subgloboso, elipsoidal u oblongo menores de 5  $\mu\text{m}$  de largo y ancho, de color verde oscuro profundo cercano a gris pasando por verde y verde amarillo. Los conidioforos no están bien definidos y los conidios tienden a acumularse dentro de masas pulvinadas, los agregados formados de hifas entrelazadas produciendo fiálides. Las clamidosporas tienden a ser de globosas a subglobosas, terminales o intercalares de tono verde y menores a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Aceves, 2001).

#### **2.4.4. Mecanismos de acción**

*Trichoderma* ha sido usado para combatir enfermedades en diversos cultivos como: algodón, ciruelos, uvas, camotes, lechuga, cebolla, arveja, manzanas y zanahorias causadas por patógenos como: *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia* sp., *Botrytis* sp., y *Fusarium* sp. Varios aislamientos han demostrado ser exitosos en invernaderos y campo abierto, en el suelo y la filósfera (Cueva, 2007).

Los modos de acción de estos hongos antagonistas pueden resumirse en mecanismos directos, que engloban el micoparasitismo, la antibiosis y la competición; e indirectos, que incluyen la estimulación del crecimiento y la inducción de resistencia vegetal a estrés biótico y abiótico. Todos estos mecanismos pueden darse de forma simultánea en un mismo aislado, no siendo excluyentes ninguno de ellos. De la eficacia de cada uno de ellos o de su combinación dependerá el éxito en la supresión de la enfermedad del aislado (López, 2011).

Entre los principales mecanismos antagónicos utilizados por *Trichoderma* spp., se puede mencionar los siguientes:

**Antibiosis:** Esta ocurre cuando hay producción de metabolitos tóxicos o antibióticos de un organismo con acción directa sobre otro. Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir antibióticos en cultivos puros, lo cual es la más fuerte evidencia de la posible acción de este tipo de compuestos como mecanismo de ataque de *Trichoderma* spp., bajo condiciones de campo. No obstante para este hongo en particular la producción de metabolitos está fuertemente ligada a la producción de enzimas propias del proceso de micoparasitismo (Cueva, 2007).

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diverso en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitorias fueron consideradas antibióticos (Martínez *et al.*, 2013).

*Trichoderma* produce sustancias como trichodermina, dermadina, sequisterpeno, suzukacillina, alamethicina, trichotoxina y acetaldehído, todas con propiedades antifungosas y antibacteriales; adicionalmente enzimas como  $\beta$ -1,3 glucanasa, quitinasa y celulasa son producidas por varias especies de *Trichoderma* que facilitan la habilidad del antagonista para atacar un amplio rango de patógenos ejerciendo su efecto sobre las paredes celulares (Ávila, 2010).

*Trichoderma* produce una variedad de metabolitos secundarios volátiles Ej: *Trichoderma koningii* produce un olor a coco y no volátiles, algunos de los cuales inhiben a otros

organismos con los cuales no establece contacto físico. Entre las sustancias inhibidoras se encuentran la gliotoxina, viridina y gliovirina (Cueva, 2007).

**Micoparasitismo:** Este es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas: Crecimiento quimiotrófico donde *Trichoderma* puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes. Reconocimiento: Se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato. Adhesión y enrollamiento: Ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno y Actividad lítica: Producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* (Martínez *et al.*, 2013).

El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación. Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. En el parasitismo a nivel microscópico no todas estas interacciones son siempre observadas, pues al parecer dependen del aislamiento de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones del ambiente (Ávila, 2010).

**Competencia:** Se produce cuando dos o más organismos demandan un mismo recurso vital. La competencia entre agentes de control biológico y el fitopatógeno puede resultar en control biológico por aniquilación de la población perjudicial, y que puede favorecer a *Trichoderma* spp., debido a su alta frecuencia de crecimiento y desarrollo (Cueva, 2007).

La presencia de *Trichoderma* en suelos agrícolas y naturales en todo el mundo es una evidencia, de que es un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, y de su plasticidad ecológica. La competencia por nutrientes de *Trichoderma*, es principalmente por carbono, nitrato y hierro. De forma general, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista se encuentra, la alta velocidad de crecimiento que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en



bloquear el paso al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista (Ávila, 2010).

*Trichoderma* está adaptado biológicamente para una colonización agresiva de nutrientes disponibles y persistencia como clamidosporas y conidias cuando los nutrientes son escasos. Las características saprofiticas de este género están reflejados en su uso como agente de biocontrol, cuando es inducido a comenzar su crecimiento por la presencia de nutrientes, este coloniza el sustrato rápidamente, algunas veces empleando antibiosis o micoparasitismo directo contra sus competidores. La competencia por nutrientes también parece ser aquí el mecanismo más potente empleado por algunas razas de *Trichoderma* para el control de *Fusarium* (Cueva, 2007).

## **2.5. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE *Trichoderma* EN INTERACCIÓN CON DIFERENTES PATÓGENOS EN CULTIVOS**

Los hongos del género *Trichoderma* son comúnmente utilizados para el control biológico de microorganismos fitopatógenos del suelo. Esta información se sustenta en los estudios realizados por Chérif y Benhamou (1990), los cuales estudiaron los aspectos citoquímicos de la distribución quitina durante la acción parasitaria de *Trichoderma* sp., en *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (FORL). Los resultados obtenidos mediante la microscopía electrónica de barrido de la interacción in vivo entre *Trichoderma* y FORL en plantas de tomate, revela la producción de metabolitos secundarios (quitinasas y glucanasas) que degradan la pared celular de FORL durante la actividad micoparasitaria. Además estos investigadores observaron que la hifa de *Trichoderma* causa la inhibición del crecimiento de FORL cuando se realizaron las pruebas de laboratorio del enfrentamiento dual.

Asimismo los estudios histológicos sobre la inducción de resistencia en plantas de tomate contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis – lycopersici* (FORL) por *Trichoderma* spp., realizados por Hibar *et al.*, (2007), demuestran una colonización intensiva de *Trichoderma* spp., en todo el sistema de la raíz incluyendo la epidermis, la corteza y la endodermis. Las hifas de FORL que lograron penetrar al tejido del hospedante se observaron una marcada desorganización de su citoplasma y la descomposición de la pared celular. Bajo estos antecedentes podemos afirmar que *Trichoderma* aplicada como un biofungicida

desencadena en los microorganismos patógenos de plantas como FORL una respuesta del hospedante y contribuye a restringir el crecimiento, avance y desarrollo del microorganismo fitopatógeno.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. UBICACIÓN DEL PROYECTO

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Nacional de Loja; la fase de campo se la realizó en el invernadero (estructura de hormigón armado, ventanales de vidrio y cubierta de fibra de vidrio) del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables y la fase de laboratorio se la cumplió en el Centro de Biotecnología.

##### 3.1.1. Ubicación ecológica de la Argelia

Posee una precipitación de 800 milímetros de promedio anual, 16° C de temperatura media anual y una zona de vida, según Holdridge, bosque seco montano bajo (bs-MB).

##### 3.1.2. Ubicación política

La Universidad Nacional de Loja se encuentra ubicada en el barrio la Argelia; parroquia San Sebastián, Cantón Loja, perteneciente a la provincia de Loja, en el sur del Ecuador (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa de ubicación de la investigación.

**Fuente:** CINFA, 2014.

### **3.1.3. Ubicación geográfica del invernadero**

Latitud: 04° 08' 04" Sur

Longitud: 79° 12' 4,3 "Oeste

Altitud: 2170 msnm.

### **3.1.4. Laboratorio de Biotecnología**

El laboratorio de Biotecnología se encuentra ubicado al sur de la ciudad y cantón Loja en la parroquia San Sebastián. Geográficamente se encuentra en las siguientes coordenadas: Latitud 04° 08' 00" S, Longitud 79° 12' 00" W y una Altitud de 2134 msnm (CINFA, 2012).

## **3.2. MATERIALES**

En la presente investigación se utilizó los siguientes materiales y equipos que se detallan a continuación:

### **3.2.1. Material de laboratorio**

**Materiales y productos:** Medios Papa Dextrosa Agar (PDA) y Caldo Papa Dextrosa (CPD), agua destilada, tubos de ensayo, estufa, baño maría, matraz, varilla de agitación, espátula, masking, algodón, alcohol potable, alcohol industrial, plato caliente, balanza analítica, bisturí, haza microbiológica, pinzas, parafina, vortex, incubadora orbital, gradillas para tubos de ensayo, matraz, erlenmeyer, vasos de precipitación, cajas de Petri, papel aluminio, guantes quirúrgicos, mascarillas, papel de filtro, cubre y porta objetos, tubos eppendoff, gasa, cámara de Neubauer, mecheros, autoclave, microscópicos, cámara fotográfica, guantes plásticos, pipetas, probetas.

### **3.2.2. Material de campo**

GPS, cámara fotográfica, palas, podadora, fundas plásticas, sacos, bombas de fumigar, insumos químicos, regaderas, carretilla de desinfección al vapor, tierra, arena sílica y turba, escalas de evaluación externa propuesta por Veintimilla (2007).

### **3.2.3. Material de escritorio**

Computadora, libreta de campo, registros y documentos digitales.

## **3.3. METODOLOGÍA**

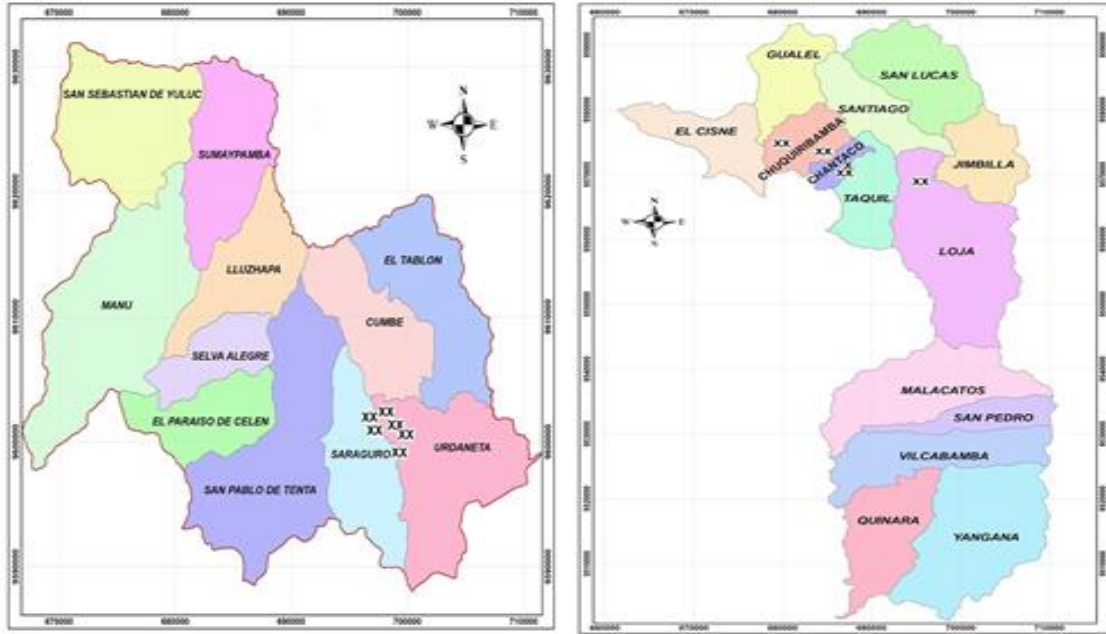
Para el desarrollo del presente trabajo fue necesario optar por la selección, utilización, aplicación pertinente y secuencial de una serie de métodos; los mismos que permitieron seguir los procedimientos adecuados para la realización del trabajo en curso y así cumplir con los objetivos planteados, los cuales se mencionan a continuación:

### **3.3.1. Metodología para el primer objetivo**

“Evaluar la Incidencia y Severidad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) en la provincia de Loja”.

#### **3.3.1.1. Determinación de los sitios de estudio**

Para evaluar la incidencia y severidad se trasladó a los sitios donde se ha identificado la presencia de la MVB, en estudios anteriores Gómez y Macas (2014) (Cuadro, 1) y (Figura, 2). Además se realizó una observación visual y se evidenció la sintomatología en las plantas de Babaco, utilizando una escala descriptiva de evaluación (Cuadro 2). Cada observación fue acompañada de una descripción detallada del lugar evaluado (Cuadro 3).



**Figura 2.** Ubicación de los sectores donde se identificó la presencia de la MVB en la provincia de Loja.

**Fuente:** CINFA, (2014).

**Cuadro 1.** Sectores donde se identificó la presencia de la MVB en provincia de Loja.

<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Localidad</b>
<b>Loja</b>	El Valle	Amable María
		El Alumbre
<b>Loja</b>	Chantaco	Reyminchá
		El Carmelo
<b>Saraguro</b>	Tenta	Cochapamba
	Saraguro	Tuncarta
		Quisquinchir
		Las Lagunas

**Fuente:** Gómez y Macas, (2014).

### 3.3.1.2. Determinación de la incidencia

Se calculó la proporción de plantas enfermas respecto al total de plantas presentes en cada una de las localidades en estudio, la que se expresó en porcentaje. Al final se calculó un valor de incidencia promedio por cada sitio, para lo cual se empleó la siguiente Ecuación 1.1 (Cooke, 2006):

$$I (\%) = \frac{n}{N} \times 100$$

Dónde: **I (%)** = Incidencia; **n** = número de plantas enfermas y **N** = número de plantas total evaluadas.

### 3.3.1.3. Determinación de la severidad

Para evaluar la severidad, se generó una escala cualitativa provisional para poder determinar los porcentajes de daño ocasionados por la enfermedad. Esta escala cualitativa de severidad, consistió en cinco clases según el progreso que presentó la enfermedad en la planta. Los grados son presentados en el Cuadro 1, donde se utilizaron indicadores numéricos para la severidad de la Marchitez Vascular del Babaco, similares a los utilizados por Cueva (2007). La severidad fue calculada con la siguiente Ecuación 1.2:

$$S (\%) = \frac{\sum(a \times b)}{N \times K} \times 100$$

Dónde: **S (%)** = Severidad, **a** = total de plantas en cada grado de la escala; **b** = grado de la escala correspondiente; **N** = número de plantas total evaluadas **K**= grado máximo de la escala (K=5) (Townsend y Heuberger 1943).

**Cuadro 2.** Escala de evaluación de la severidad externa.

<b>Nivel</b>	<b>Síntomas</b>
<b>0</b>	Planta sana
<b>1</b>	Clorosis inicial de las primeras hojas bajas.
<b>2</b>	Clorosis intensa de aproximadamente el 50 % del follaje. Defoliación moderada.
<b>3</b>	Clorosis total del follaje. Defoliación severa. Bandas oliváceas longitudinales y deprimidas en el tallo.
<b>4</b>	Plantas completamente defoliadas. Necrosis descendente desde el ápice del tallo (muerte de la planta)

**Fuente:** Cueva, (2007).

**Cuadro 3.** Datos tomados en la evaluación de la incidencia y severidad de la Marchitez Vascular del Babaco.

**A) Datos Generales:**

Muestra No:	Cultivo hospedero:
Localidad:	Edad del cultivo:
Coordenadas geográficas	Cultivos anteriores:
Fecha de observación:	Dueño del predio:

**B) Apariencia general del cultivo**

Marchitez:	Tizones:
Amarillamiento:	Desarrollo anormal:
Áreas muertas:	Otros:
Manchas foliares:	



### C) Partes atacadas de las plantas

Raíz:	Brotes o tallos:
Hojas:	Flores
Frutos:	

### D) Distribución de la enfermedad

Plantas aisladas:	Manchones o grupos de plantas:
Áreas Grandes:	Áreas pequeñas
Bandas o franjas:	Borde de cultivo

#### 3.3.2. Metodología para el segundo objetivo

“Determinación del biocontrol de *Fusarium* spp., en interacción con *Trichoderma* spp., causantes de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante pruebas de inoculación bajo condiciones controladas”.

##### 3.3.2.1. Aislados de *Fusarium* y *Trichoderma* spp.

Se utilizaron dos aislados purificados de *Fusarium oxysporum* causantes de la Marchitez Vascular del Babaco, estos fueron seleccionados por presentar patogenicidad alta y baja, en estudios anteriores (Armijos y Salinas, 2014; Gómez y Macas, 2014). En cambio, el aislado de *Trichoderma* spp., fue caracterizado morfo-cultural por Villa, (2015) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Caracterización morfo-cultural, molecular y patogénicamente de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* spp.

Código de Aislado	Pares de Bases	Accesión	Identidad (Blastn)	Especie
CHA1	364 bp	KF214790	100%	<i>Fusarium oxysporum</i>
QUI2	366 bp	KF214790	100%	<i>Fusarium oxysporum</i>
ECM6				<i>Trichoderma</i> spp.

**Leyenda:** Chantaco (CHA1), Quisquinchir (QUI2), y El Carmelo (ECM6).

### 3.3.2.2. Material vegetal

Se utilizaron 42 plantas de Babaco de 60 días después de la siembra (dds). Todas las plantas se las sometieron a un periodo de cuarentena de 60 días (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Actividades desarrolladas en la etapa de cuarentena.

Tiempo	Objetivo	Producto	Dosis
10 días	Insectos (mosca blanca)	Bala 55	1,5-2 Kg/ha
15 días	Enfermedades	Oidium (Azufre 80% cup)	1,5-2 Kg/ha
30 días	Fertilización	Abonagro	1 Kg/200l agua
	Riego 2 veces/semana	Agua	0,5 l/planta

### 3.3.2.3. Cultivo y multiplicación de los aislamientos de *Fusarium* spp.

Se cultivaron colonias puras de los dos aislados de *Fusarium* spp., en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA), conservadas en aceite mineral; mediante la extracción aséptica de las estructuras infectivas (microconidias, macroconidias y clamidosporas) de *Fusarium* causante de la Marchitez Vascular del Babaco.

Las estructuras del patógeno fueron transferidas para inocular en cajas de Petri que contenían PDA, a continuación cada caja fue rotulada, registrada y sellada con papel de Parafilm en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente almacenado a 28°C por dos semanas en una incubadora, para el crecimiento y esporulación de las colonias de *Fusarium*. Al cabo de este período, se procedió a la inoculación de los dos aislados en medio líquido Caldo de-Papa-Dextrosa (CPD). En primer lugar, se realizó un pre-inóculo en 10 cm<sup>3</sup> de medio de cultivo Caldo-Papa-Dextrosa (CPD) en tres tubos de ensayo de 20 cm<sup>3</sup> por cada cepa, para la inoculación de *Fusarium oxysporum* más patogénico (QUI2) y *Fusarium oxysporum* menos patogénico (CHA1), luego se las incubó por 14 días a ±30°C y a 300 rpm en una incubadora tipo *Shaker*.

Después de observar un buen crecimiento de cada una de las cepas se transfirió todo el contenido de los tubos de ensayo a un matraz de 800 cm<sup>3</sup> con medio de cultivo CPD.

#### **3.3.2.4. Cultivo y multiplicación de los aislamientos de *Trichoderma* spp.**

La colonia pura de *Trichoderma* spp., fue cultivada en PDA, el inóculo se obtuvo a partir de colonias conservadas en PDA, conservadas en aceite mineral; los aislados fueron cultivados en cajas de Petri que contenían medio PDA, cada caja de Petri fue rotulada, registrada y sellada con papel Parafilm en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente almacenado a 28°C por una semana en una incubadora, para el crecimiento y esporulación de las colonias de *Trichoderma* spp. Al finalizar este período, se procedió a la inoculación del aislado en medio líquido Caldo de-Papa-Dextrosa (CPD). En primer lugar, se realizó un pre-inóculo en 10 cm<sup>3</sup> de medio de cultivo Caldo-Papa-Dextrosa (CPD) en tres tubos de ensayo de 20 cm<sup>3</sup> cada uno, para la inoculación de *Trichoderma* spp., con mayor cantidad de conidios (ECM6), luego se las incubó por 14 días a ±30°C y a 300 rpm en una incubadora tipo *Shaker*. Después de observar un buen crecimiento de la cepa se transfirió todo el contenido de los tubos de ensayo a un matraz de 800 cm<sup>3</sup> con medio de cultivo CPD.

#### **3.3.2.5. Preparación de la suspensión de esporas de *Fusarium* spp., y *Trichoderma* spp.**

Trascurrido 14 días de incubación en medio líquido, se filtró 2 ml de cada una de las cepas en tubos *ependorff*. Una vez obtenida la suspensión de esporas, se prosiguió al conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) utilizando un hematócmetro de Neubauer en un microscopio Olympus Serie: 1D81617, Japón con aumento de 40X. Donde se realizó el conteo de la cantidad de conidios en la cámara de Neubauer (Anexo 1). Para ello se utilizó la Ecuación 1.3 propuesta por Rojas-Triviño (2011):

$$CC = \sum n (5 \times 10\ 000)$$

**Dónde:**

CC = Concentración en la cámara

$\sum n$  = Sumatoria de células en los cinco cuadrantes

(5 X 10 000) = Constante.

Se ajustaron todas las concentraciones en una proporción de  $1 \times 10^6$  por  $\text{ml}^{-1}$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias), aplicando la Ecuación 1.4 citada por Castellanos *et al.*, (2011):

$$V_{\text{inicial}} \times C_{\text{inicial}} = V_{\text{final}} \times C_{\text{final}}$$

**Dónde:**

$V_{\text{inicial}}$  = Volumen inicial del inóculo que deseamos preparar

$C_{\text{inicial}}$  = Concentración inicial del inóculo

$V_{\text{final}}$  = Volumen final del inóculo que deseamos preparar

$C_{\text{final}}$  = Concentración final deseada del inóculo ( $1 \times 10^6$ ).

### **3.3.2.6. Inoculación de raíces en plantas de Babaco, con *Fusarium* spp., y *Trichoderma* spp.**

Se utilizaron 42 plantas de 60 días después de la siembra (dds), en invernadero fueron inoculadas con suspensiones conidiales de las dos cepas de *Fusarium oxysporum* (QUI2 y CHA1), una cepa de *Trichoderma* (ECM6) y un testigo (agua destilada estéril). El ensayo del biocontrol se realizó bajo un diseño completamente al azar con seis tratamientos (una planta por tratamiento) y siete repeticiones. Los tratamientos utilizados fueron (Cuadro 6):

**T0** = Inoculación con agua destilada (Testigo).

**T1** = **QUI2** (Quisquinchir) *Fusarium oxysporum* [patogenicidad alta]

**T2** = **CHA1** (Chantaco) *Fusarium oxysporum* [patogenicidad baja].

**T3** = **ECM6** (El Carmelo) *Trichoderma* spp [mayor cantidad de conidios].

**T4** = **QUI2** *Fusarium oxysporum* [patogenicidad alta] + **ECM6** *Trichoderma* spp [mayor cantidad de conidios].

**T5** = **CHA1** *Fusarium oxysporum* [patogenicidad baja] + **ECM6** *Trichoderma* spp [mayor cantidad de conidios].

**Cuadro 6.** Distribución de los tratamientos bajo invernadero.

I	II	III	IV	V	VI	VII
T0	T3	T1	T5	T2	T4	T0
T3	T1	T5	T2	T4	T0	T3
T1	T5	T2	T4	T0	T3	T1
T5	T2	T4	T0	T3	T1	T5
T2	T4	T0	T3	T1	T5	T2
T4	T0	T3	T1	T5	T2	T4

La inoculación se la realizó de la siguiente manera: El tratamiento testigo (T0), el sistema radical de las plántulas se sumergió en una maceta que contenía 2000 ml de agua destilada estéril durante 10 minutos. Posteriormente, el sistema radical de las plántulas de Babaco del tratamiento T1, fue inoculada por sumersión en 2000 ml de suspensión conidial de la cepa de *Fusarium oxysporum* más patogénico (QUI2) a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml durante 10 minutos. Asimismo, con el tratamiento T2 (cepa de *Fusarium oxysporum* menos patogénico CHA1) y el tratamiento T3 (cepa de *Trichoderma* ECM6). En cambio, los tratamientos T4 y T5; se realizó primero la inoculación con cada una de las cepas de *Fusarium* durante 10 minutos y después de 30 minutos se inocularon con la cepa de *Trichoderma* por 10 minutos; de acuerdo a los tratamientos y a la distribución de los mismos (Cuadro 5). Finalmente, las plantas de Babaco inoculadas fueron trasplantadas en contenedores plásticos de 2 kg de capacidad que contenían una mezcla esterilizada de tierra, arena y tuba en una relación 2:1:1. El sustrato se esterilizó mediante vapor húmedo a una temperatura de  $\pm 200^\circ\text{C}$  durante 4 horas.

Todas las unidades experimentales se regaron con 400ml de agua destilada al momento de la inoculación y posterior a esta, siguiendo el calendario previamente establecido, bajo condiciones de invernadero.

### **3.3.2.7. Evaluación de la severidad de la enfermedad**

La severidad de la enfermedad se evaluó por el grado de daño expresado en síntomas externos, los cuales fueron estimados visualmente según la escala propuesta por Cueva (2007) (Cuadro 7). Los síntomas externos se evaluaron desde el día posterior a la

inoculación hasta los 40 días ddi. Las plantas fueron cortadas, para realizar los estudios histológicos. Cabe recalcar, que para la evaluación de la severidad solo se tomaron en cuenta los tratamientos T1, T2, T4 y T5 y para los estudios histológicos, se tomaron en cuenta todos los tratamientos. La severidad fue calculada con la siguiente Ecuación 1.5:

$$S (\%) = \frac{\sum(a \times b)}{N \times K} 100$$

Dónde: **S (%)** = Severidad, **a** = total de plantas en cada grado de la escala; **b** = grado de la escala correspondiente; **N** = número de plantas total evaluadas **K**= grado máximo de la escala (**K=5**) (Townsend y Heuberger 1943).

**Cuadro 7.** Escala de evaluación externa de la Marchitez Vascular del Babaco.

Nivel	Síntomas
0	Planta sana.
1	Clorosis inicial de las primeras hojas bajas.
2	Clorosis intensa de aproximadamente el 50 % del follaje. Defoliación moderada.
3	Clorosis total del follaje. Defoliación severa. Bandas oliváceas longitudinales y deprimidas en el tallo.
4	Plantas completamente defoliadas. Necrosis descendente desde el ápice del tallo (muerte de la planta).

**Fuente:** Cueva, (2007).

### 3.3.3. Metodología para el tercer objetivo

“Realizar estudios histológicos de la interacción *Fusarium-Trichoderma*-Babaco en diferentes estadios de crecimiento de la planta”.

#### 3.3.3.1. Material vegetal

Se procesaron muestras de Babaco con infecciones inducidas por *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp., e interacción *Fusarium-Trichoderma*. Las muestras con infecciones inducidas con *Fusarium oxysporum*, se realizó un muestreo destructivo. En cambio, las

muestras con infecciones inducidas con *Trichoderma*, se realizó un muestreo fitoprotector, todos estos muestreos se realizaron a nivel histológico.

El material vegetal producto del segundo objetivo, sirvió para la realización de los estudios histológicos. De acuerdo a cada tratamiento, se procedió a seleccionar una planta de referencia. Es así que, se lavaron las raíces con bastante agua para eliminar las impurezas, luego se disectaron en una región comprendida desde la base de la raíz hasta 10 cm. El material recolectado se preparó para los estudios histológicos de acuerdo a la siguiente metodología propuesta por Ortiz (2012):

**Corte:** Se procedió a obtener una muestra del tallo cortándolo en forma cúbica en el cual se realizó cortes transversales de la muestra en el micrótopo de un grosor de 10 µm.

**Fijación:** Las muestras cortadas se las ubicó en cajas Petri que contenían ácido acético al 5% por un tiempo de 5 minutos.

**Coloración:** Se utilizó el colorante azul de toluidina a una concentración del 0.03%, y se sumergió las muestras por 5 min. Posteriormente, las muestras se pasaron a una solución de verde malaquita al 0.3% por 5 minutos.

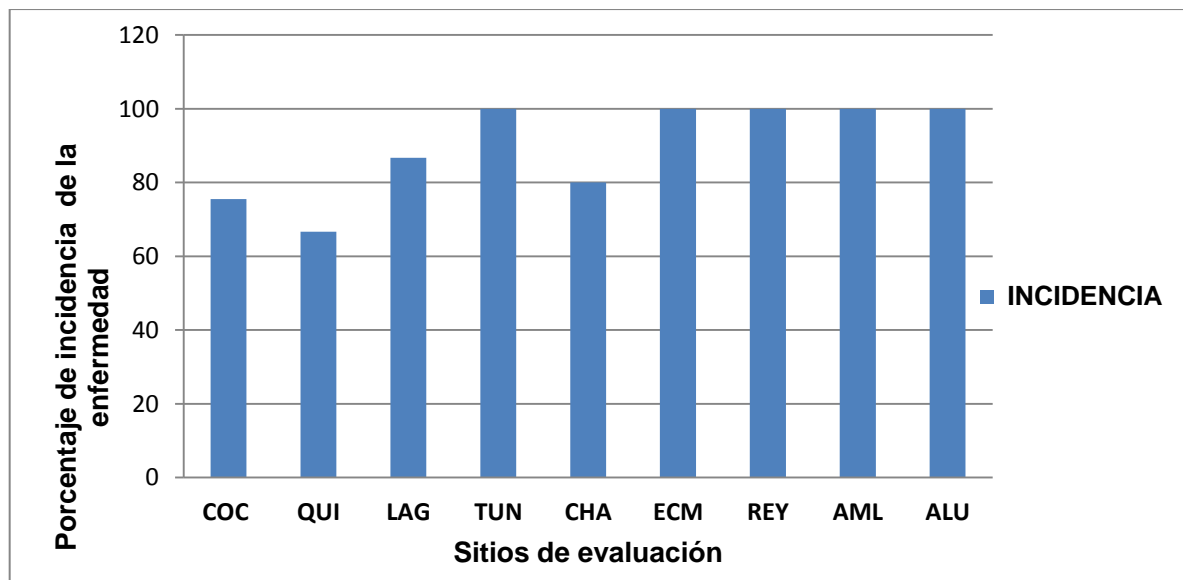
**Montaje:** Con la muestra tinturada, se realizaron los montajes en portaobjetos con glicerina, se colocó el cubreobjetos y se realizó el respectivo etiquetado, para su posterior observación.

**Observación:** Todos los montajes, fueron observados en el microscopio óptico (EVOS), el cual permitió observar los diferentes cambios morfológicos de las células y los tejidos vegetales por acción de la interacción entre microorganismos fitopatógenos y biocontrolador en el sistema *in vivo* del Babaco.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (MVB) EN LA PROVINCIA DE LOJA

En los nueve lugares de muestreo, se observó una alta incidencia de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) en un rango comprendido de 66,7 al 100%. En el sitio Cochapamba se observó una incidencia del 75,6% en 3400 de 4500 plantas de Babaco. Asimismo, en el sitio Quisquinchir se observó una incidencia de 66,7% en 800 de 1200 plantas, Las Lagunas, un 86,7% en 1300 de 1500 plantas, Tuncarta, un 100% en 3050 plantas. Chantaco, un 80% en 1000 de 1250, El Carmelo, 100% en 4610 plantas, Reymincha 100% de 250 plantas. En Amable María 100% en 1200 plantas y en El Alumbre 100% de 300 plantas (Figura 3).



**Figura 3.** Incidencia de la Marchitez Vascular del Babaco en la provincia de Loja

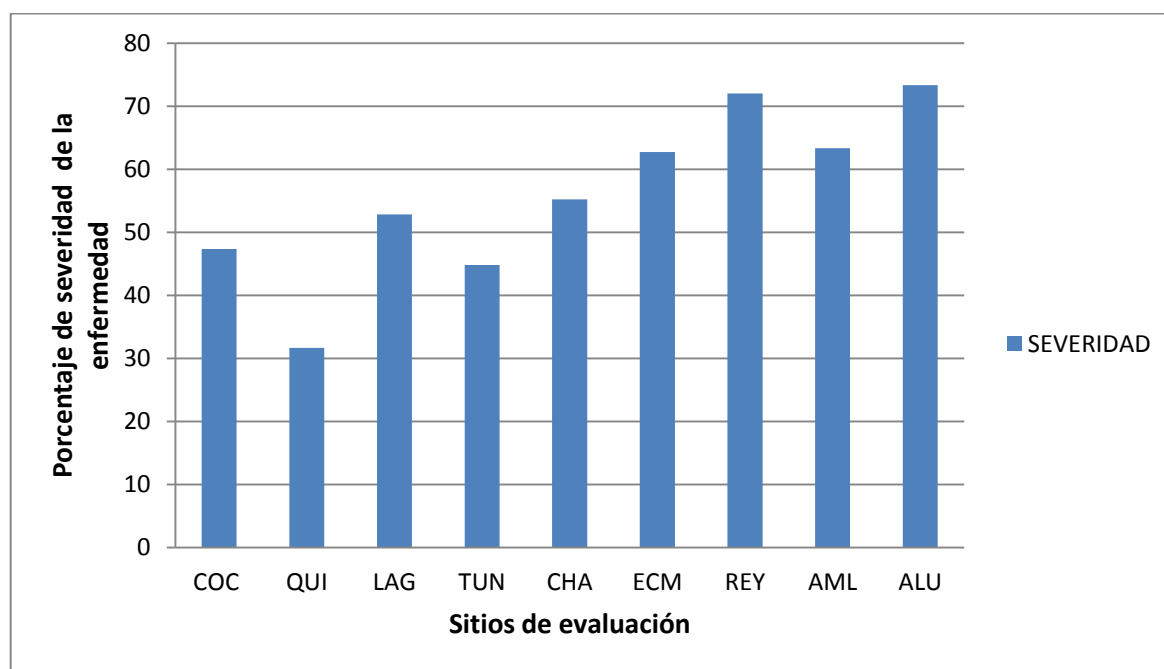
**Leyenda:** (COC) Cochapamba, (QUI) Quisquinchir, (LAG) Las Lagunas, (TUN) Tuncarta, (CHA) Chantaco, (ECM) El Carmelo, (REY) Reymincha, (AML) Amable María y (ALU) El Alumbre.

La severidad no se determinó por unidades de muestreo, como en el caso de la incidencia, en este caso se tomaron el número total de plantas evaluadas en los nueve sitios estudiados. Es así, que en el sitio de estudio Cochapamba, se determinó que de 4500 plantas evaluadas,



fueron considerados en la clase tres, cuatro y cinco de la escala de daño utilizada, la cual representó un 47.3 % de severidad.

En el sitio Quisquinchir de 1200 plantas evaluadas, fueron consideradas en la clase dos, tres, cuatro y cinco, representa un 31,7% de severidad. En Las Lagunas de 1500 plantas, se ubicaron en la clase una, tres, cuatro y cinco, representa el 52,8% de severidad. En Tuncarta de 3050 plantas evaluadas, las que se ubican en la clase uno, dos, tres, cuatro y cinco, representan 44,8% de severidad. En Chantaco de 1250 plantas, las que se encuentran en la clase cuatro y cinco, representan 55,2% de severidad. En El Carmelo de 4610 plantas evaluadas, las que se situaron en la clase dos, tres, cuatro y cinco, representan 62,7% de severidad. En Reymincha de 250 plantas evaluadas, las que se dispusieron en la clase cuatro y cinco, representan 72% de severidad. En el sitio Amable María de 1200 plantas evaluadas, las que se encuentran en la clase tres, cuatro y cinco, representan el 63,3% de severidad. Finalmente, en el sitio El Alumbre de 300 plantas evaluadas, las que se ubicaron en la clase tres y cuatro, representan 73,3% de severidad (Figura 4).

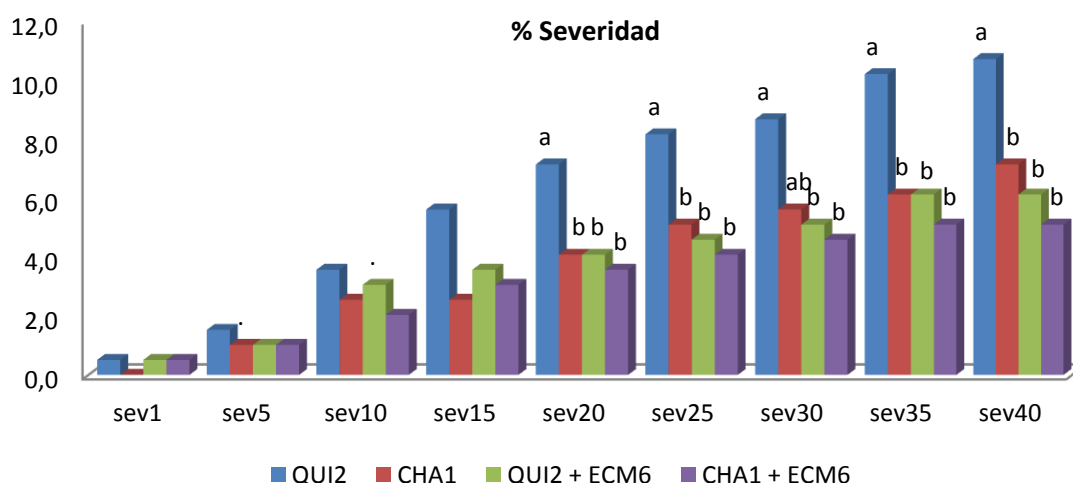


**Figura 4.** Severidad de la Marchitez Vascular del Babaco en la provincia de Loja

**Leyenda:** (COC) Cochapamba, (QUI) Quisquinchir, (LAG) Las Lagunas, (TUN) Tuncarta, (CHA) Chantaco, (ECM) El Carmelo, (REY) Reymincha, (AML) Amable María y (ALU) El Alumbre.

#### 4.2. DETERMINACIÓN DEL BIOCONTROL DE *Fusarium* spp., EN INTERACCIÓN CON *Trichoderma* spp., CAUSANTES DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (MVB), MEDIANTE PRUEBAS DE INOCULACIÓN BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.

Los resultados del análisis estadístico detectaron diferencias significativas para los tratamientos ( $p < 0.05$ ) T1, T2, T4 y T5, a partir de los 20 ddi se observa que el T5 (CHA1+ECM6) presentó un rango de severidad de 3.6%, estas plantas presentaron menor clorosis foliar y marchitez, en comparación con los demás tratamientos, seguido el tratamiento T4 (QUI2+ ECM6), presentó un rango de severidad de 4.1%. A los 40 ddi el tratamiento T1 (QUI2) presentó un porcentaje de severidad del 10.7%, obteniendo una mayor agresividad de la enfermedad causando la mayor clorosis foliar, marchitez, seguida de necrosis y una fuerte defoliación, lo que ocasionó la muerte de algunas plantas (Figura 5).



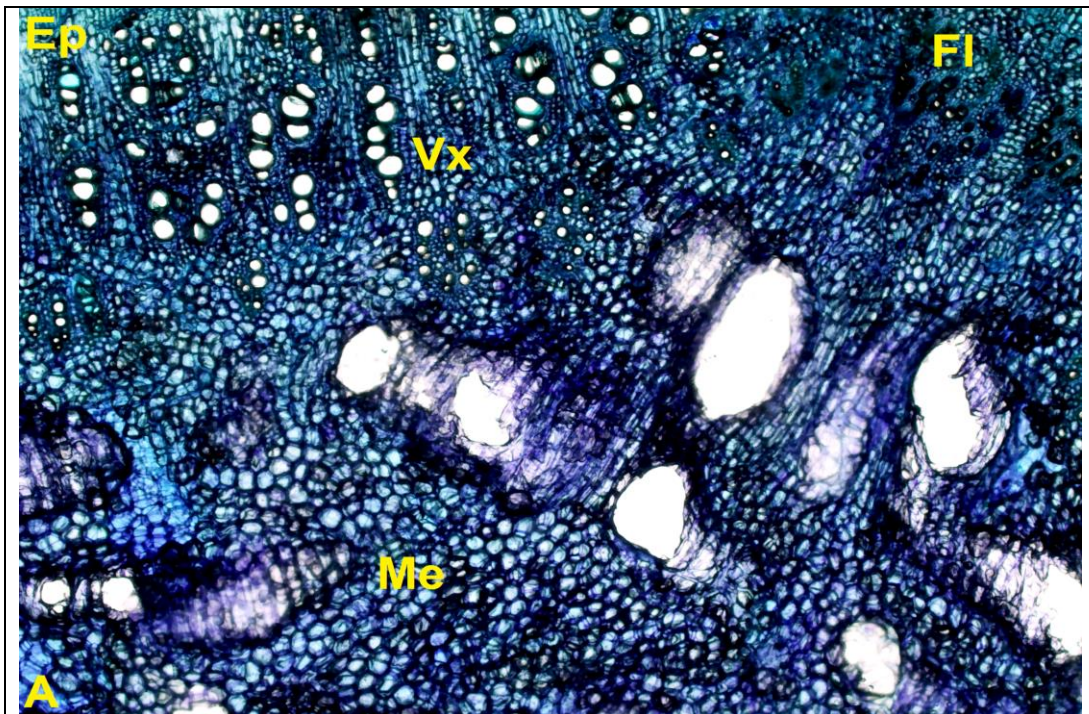
**Figura 5.** Severidad de los tratamientos con dos cepas de *Fusarium oxysporum* y una cepa de *Trichoderma* spp., sobre la Marchitez Vascular en el invernadero del AARNR.

**Legenda:** Chantaco (CHA1), Quisquinchir (QUI2), y El Carmelo (ECM6).

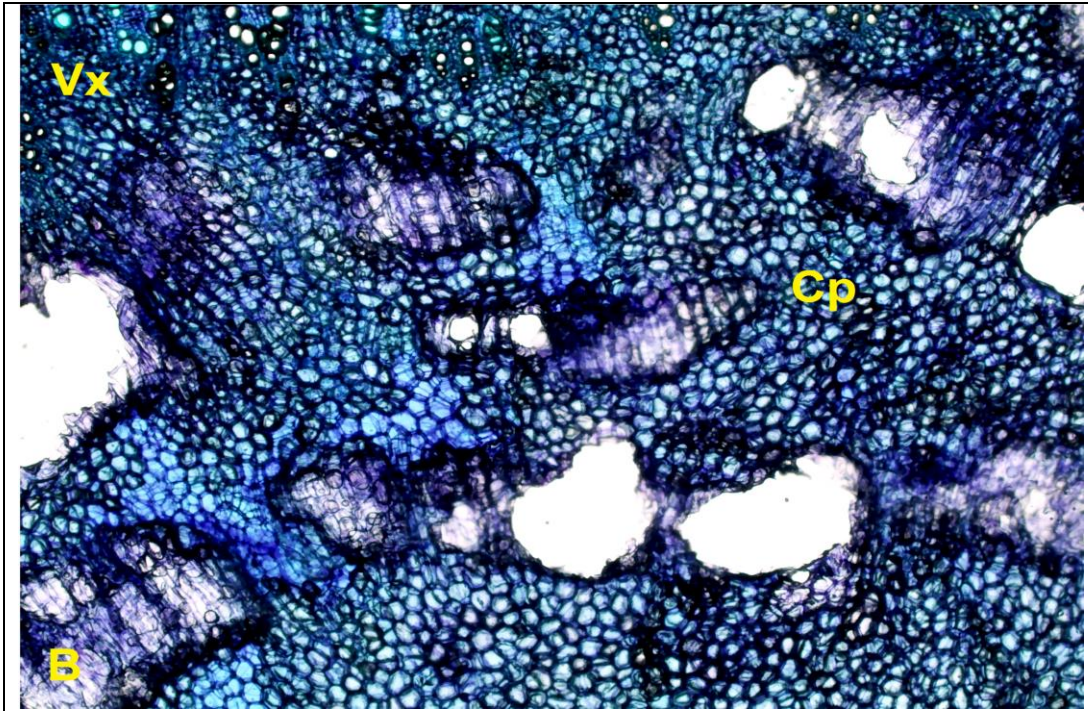
### 4.3. REALIZACIÓN DE ESTUDIOS HISTOLÓGICOS DE LA INTERACCIÓN *Fusarium-Trichoderma-Babaco* EN DIFERENTES ESTADIOS DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA.

#### 4.3.1. Histología en plantas sanas de Babaco (testigo)

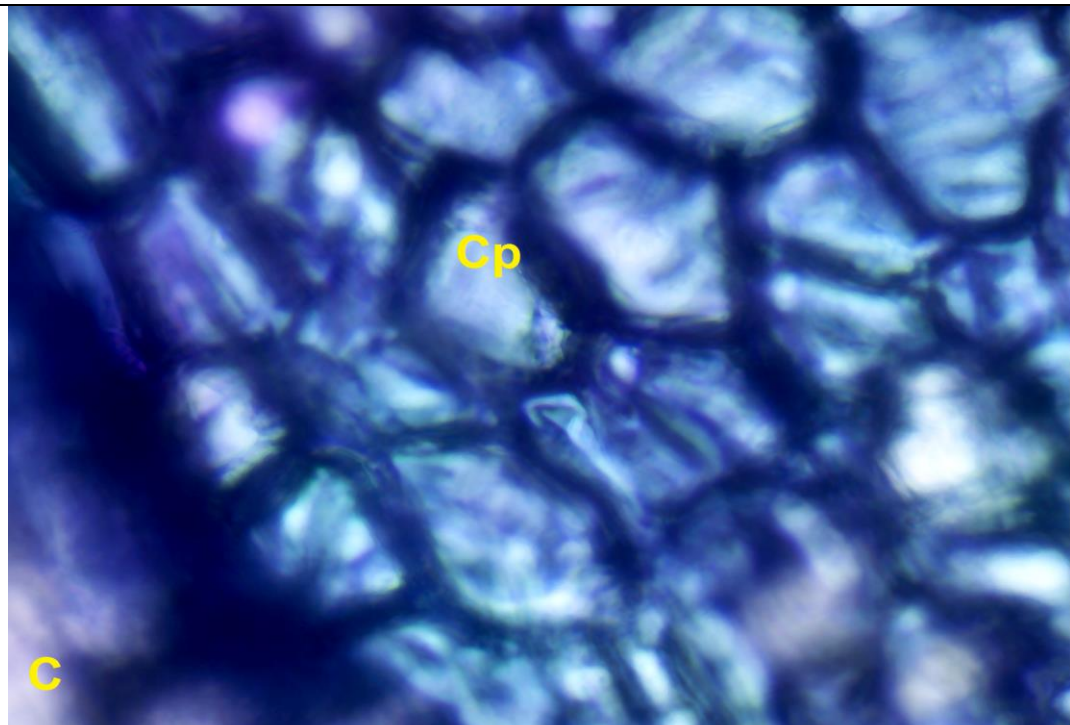
No se observaron diferencias estructurales entre cortes transversales de la base de la raíz y del cuello de la raíz. El tejido epidérmico estuvo formado por una capa uniestratificada de células alargadas y cutícula gruesa (Figura 6A y B). En la corteza, constituida por varios estratos de células parenquimatosas poliédricas (Figura 6B). El sistema vascular estuvo compuesto por epidermis, floema, vasos xilémicos, células parenquimatosas y médula y se encuentran perfectamente limpios, típico de una planta sana (Figura 6A, B y C).



**Figura 6.** A) Tejidos sanos de la base y cuello de una raíz en Babaco. **Ep** Epidermis, **Vx** Vasos del xilema, **Fl** Floema y **Me** Médula (4x) Loja, 2015.



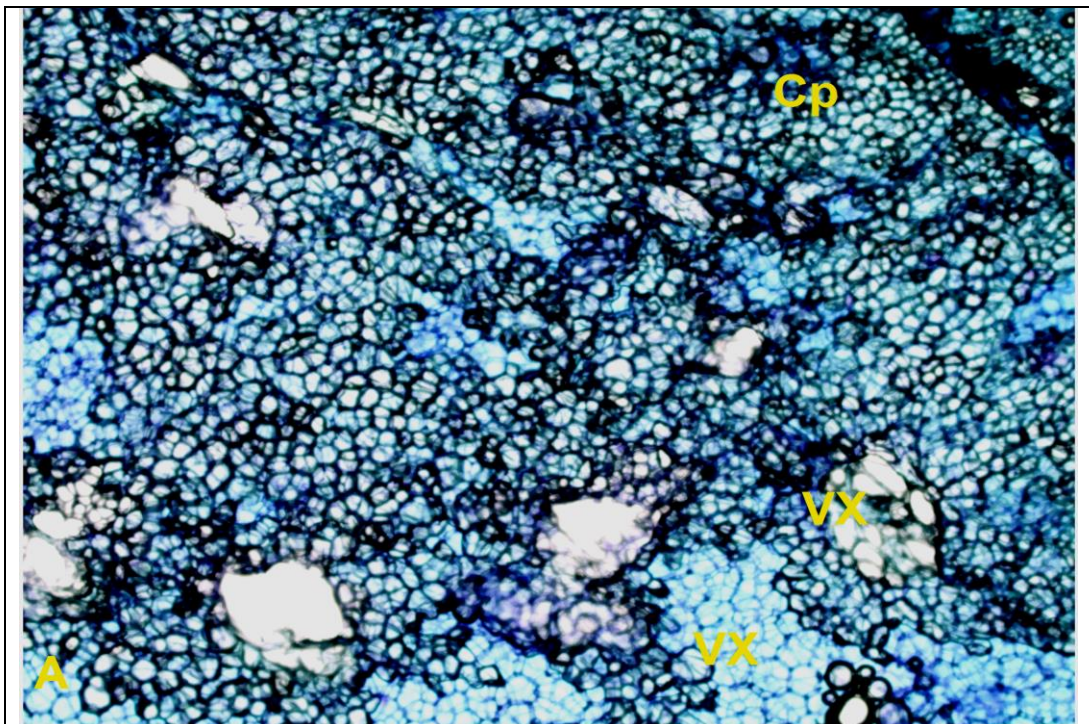
**Figura 6. B)** Tejidos sanos de la base y cuello de una raíz en Babaco, **Vx** Vasos del xilema y **Cp** Células parenquimatosas (10x) Loja, 2015.



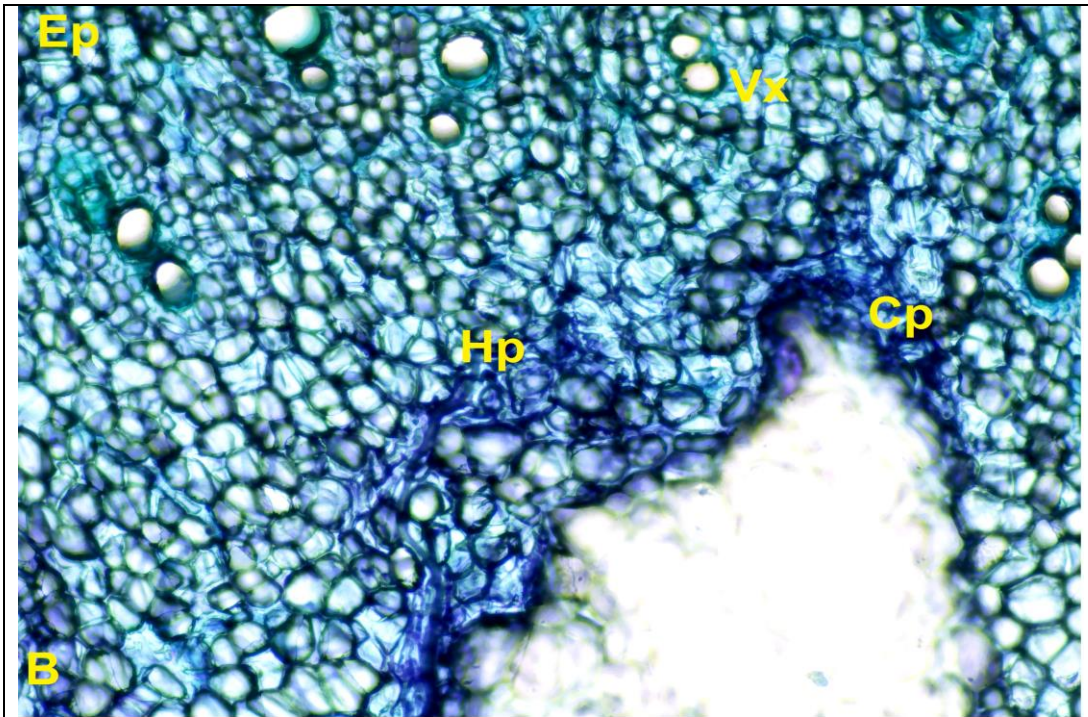
**Figura 6. C)** Tejidos sanos de la base y cuello de una raíz en Babaco. **Cp** Células parenquimatosas (40x) Loja, 2015.

#### 4.3.2. Histología en plantas de Babaco con infecciones inducidas de *Fusarium oxysporum* (QUI2 y CHA1), bajo invernadero

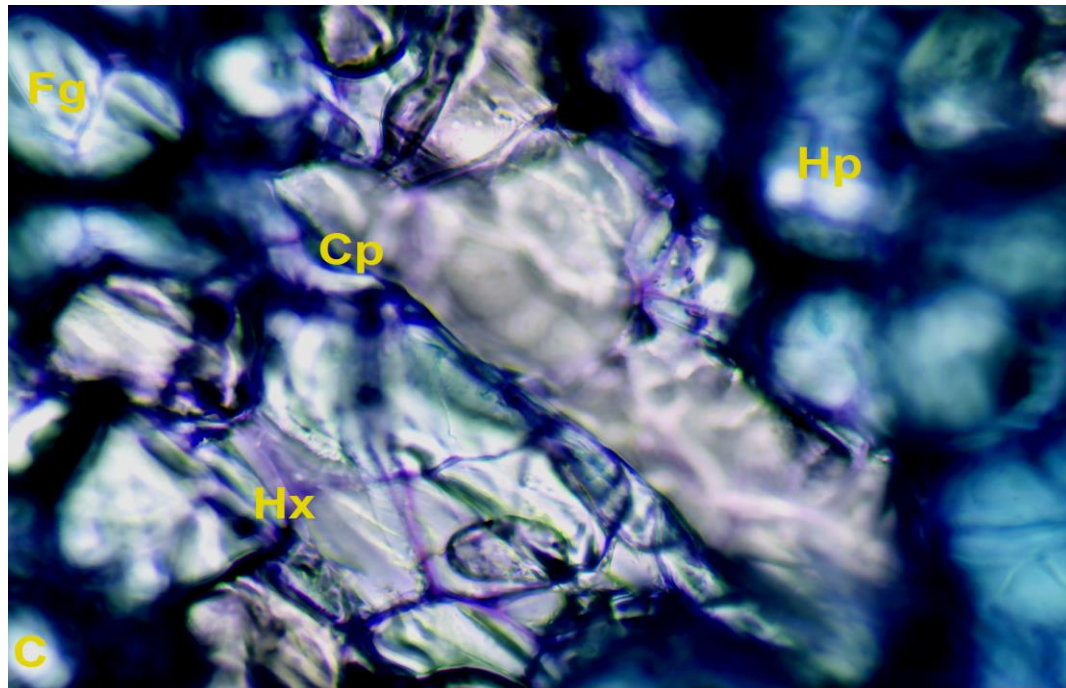
Para la cepa QUI2 *Fusarium oxysporum* (patogenicidad alta), se observaron alteraciones estructurales en los tejidos radicales del Babaco, como la plasmólisis en algunas células parenquimatosas de corteza y xilema (Figura 7A, B y C). Además, se observa la colonización total de los haces vasculares y del parénquima, debido a la colonización total del patógeno, nótese que los radios del parénquima se encuentran obstruidos y no se puede observar claramente las células parenquimatosas. Asimismo, se observa la colonización de los vasos xilémicos por parte del patógeno y la desorganización de las células, lo que ha implicado el descenso de la pared celular. Además, el floema presenta procesos de hipertrofia e hiperplasia y se observa la formación de geles en la base del tallo de una planta infectada (Figura 7C).



**Figura 7.** A) Tejidos infectados con *Fusarium oxysporum* (QUI2) de la base y cuello de una raíz en Babaco, **Vx** Vasos del xilema, **Cp** Células parenquimatosas (4x) Loja, 2015.

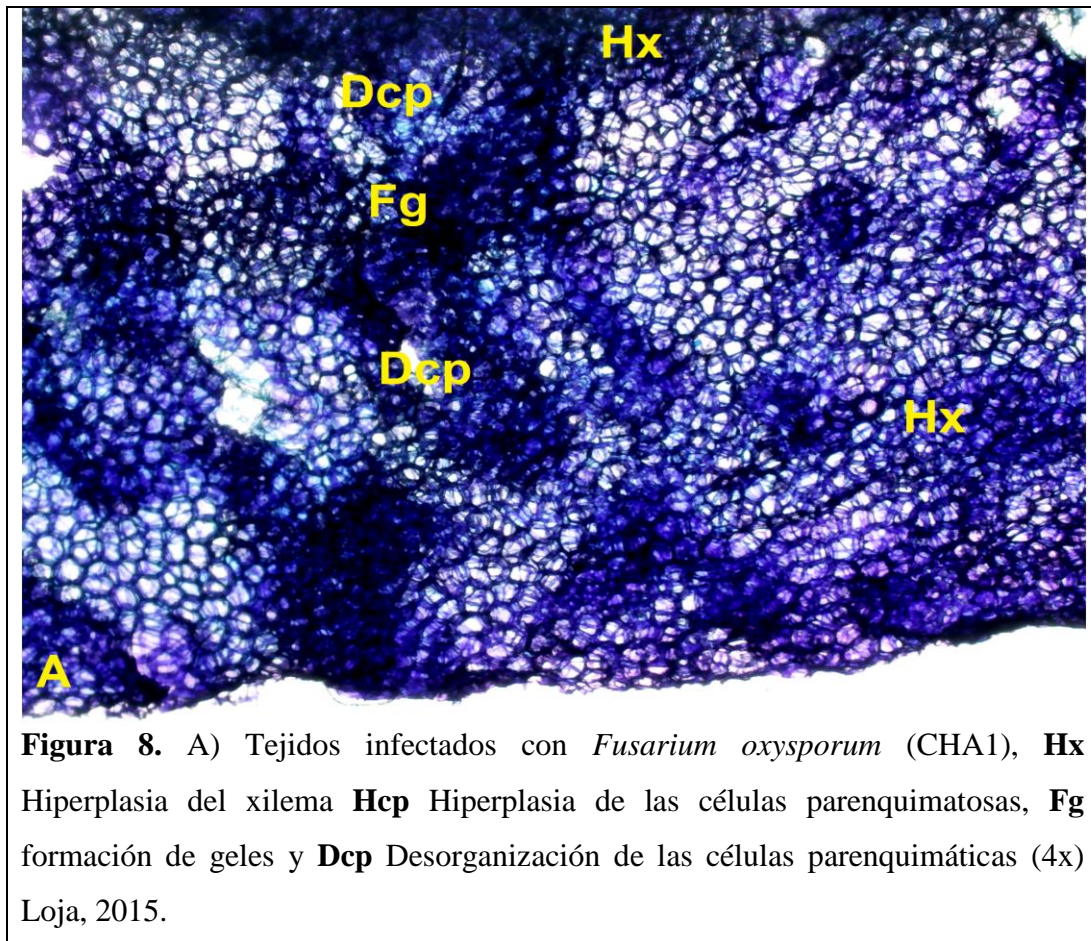


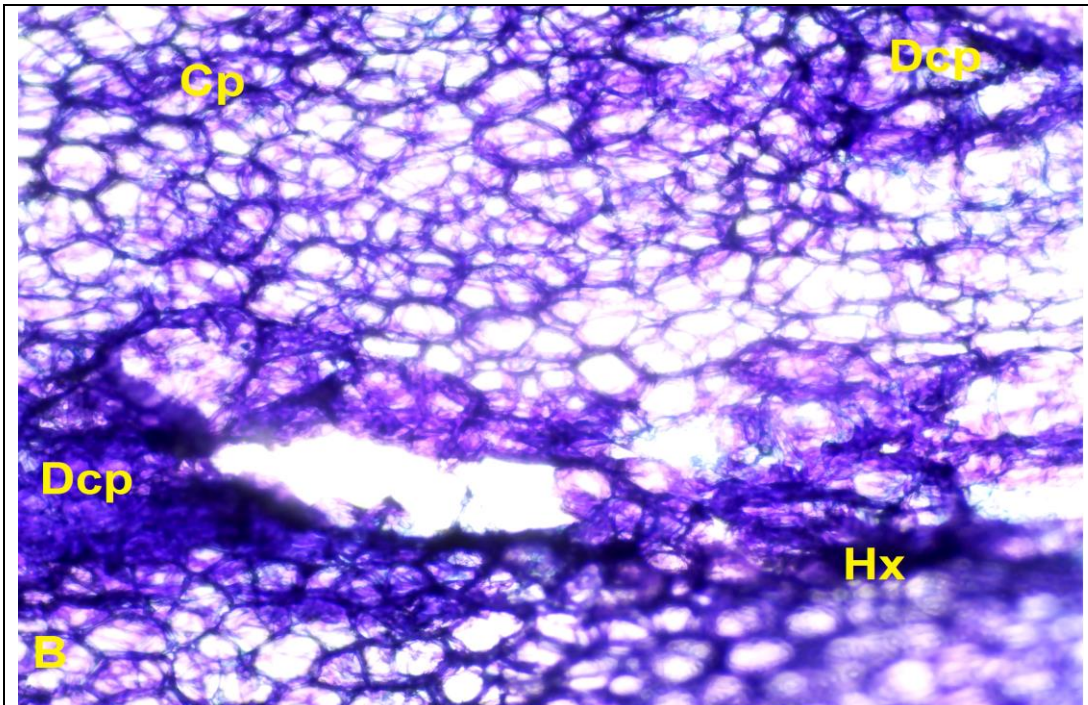
**Figura 7. B)** Tejidos infectados con *Fusarium oxysporum* (QUI2) de la base y cuello de una raíz en Babaco, **Ep** Epidermis, **Vx** Vasos del xilema, **Cp** Células parenquimatosas, **Hp** Hifas del patógeno (10x) Loja, 2015.



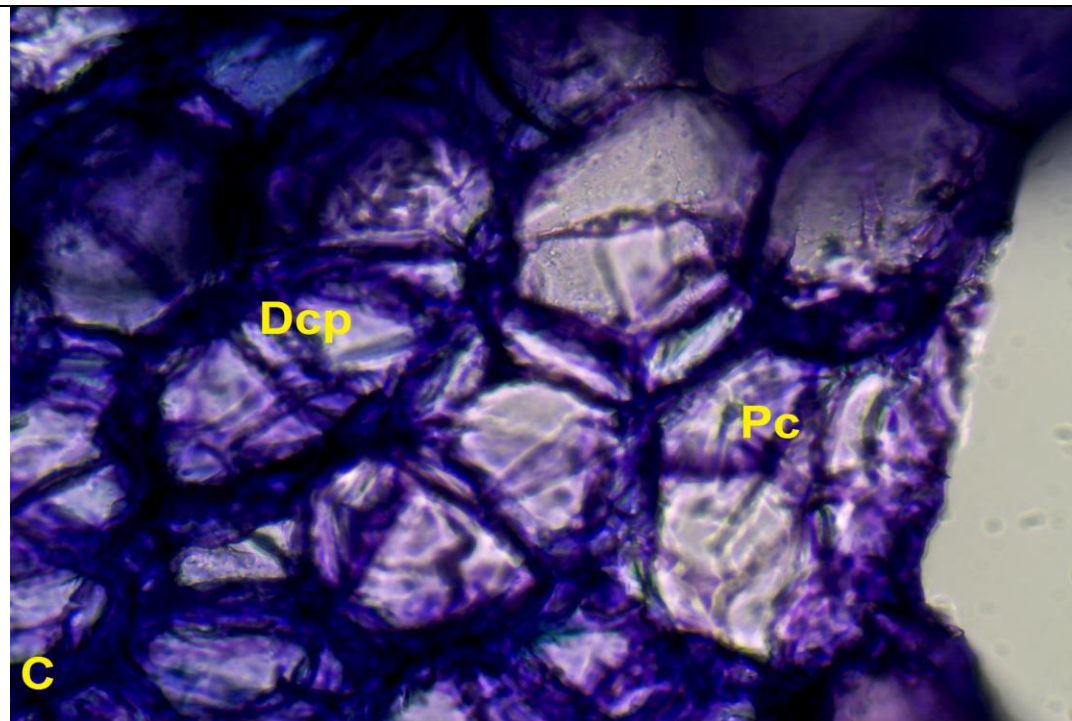
**Figura 7. C)** Tejidos infectados con *Fusarium oxysporum* (QUI2) de la base y cuello de raíz en Babaco, **Cp** Células parenquimatosas, **Hp** Hifas del patógeno **Fg** formación de geles y **Hx** hipertrofia del xilema (40x) Loja, 2015.

Para la cepa CHA1 *Fusarium oxysporum* (patogenicidad baja), en los tejidos meristemático, epidérmico, cortical, vascular y medular, no se encontraron signos del hongo, ni alteraciones estructurales severas, excepto plasmólisis en células parenquimatosas de corteza y xilema. Estos resultados contrastan la hiperplasia (en tejido meristemático, epidérmico, cortical y floema), hipertrofia (célula parenquimatosas, necrosis de la túnica y corteza) y desorganización celular (zona de meristemo, xilema) (Figura 8A, B y C)





**Figura 8. B)** Tejidos infectados con *Fusarium oxysporum* (CHA1), **Cp** Células parenquimatosas, **Hx** Hiperplasia del xilema y **Dcp** Desorganización de las células parenquimáticas (10x) Loja, 2015.

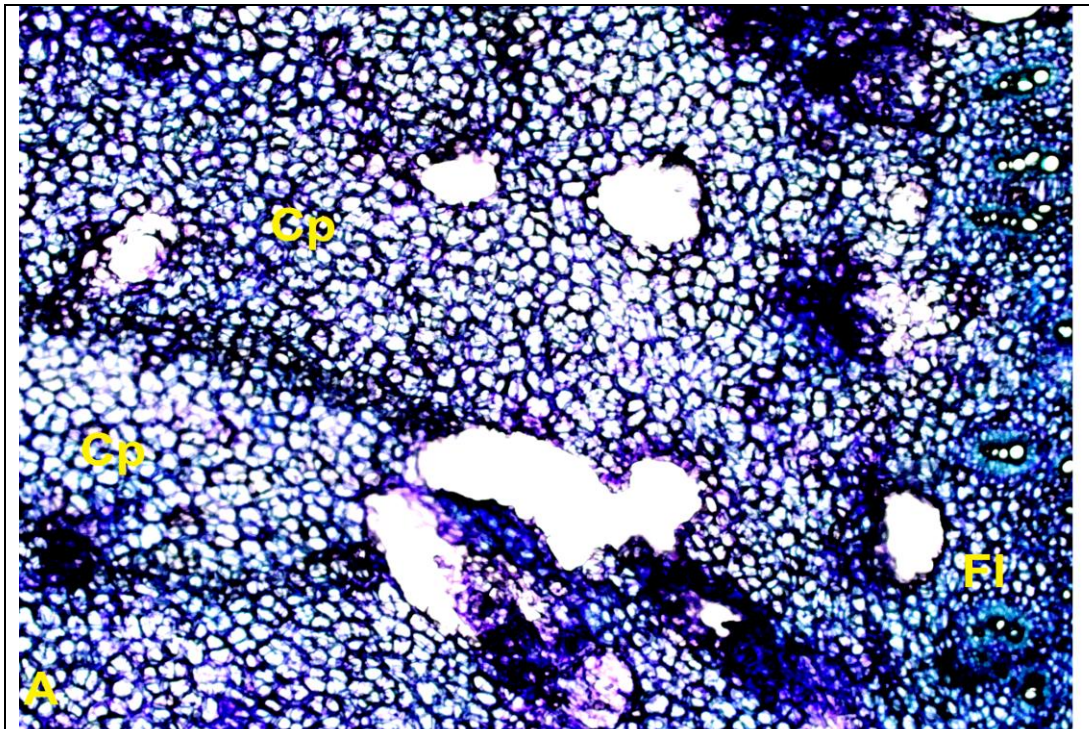


**Figura 8. C)** Tejidos infectados con *Fusarium oxysporum* (CHA1), **Pc** Plasmólisis celular y **Dcp** Desorganización de las células parenquimáticas (40x) Loja, 2015.

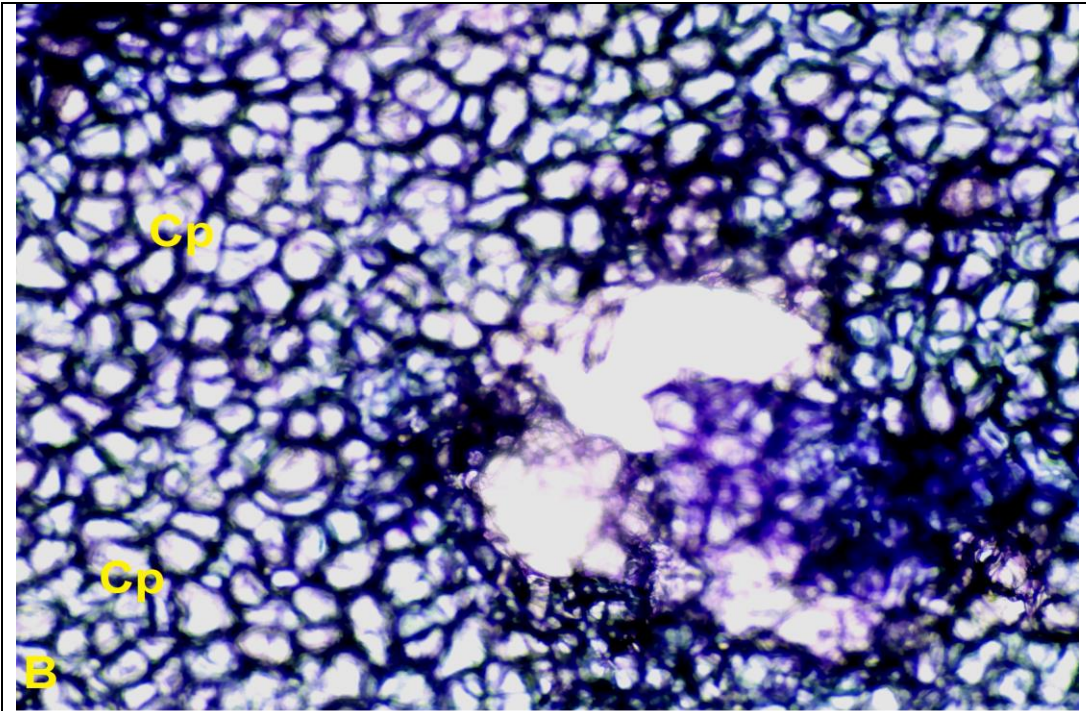


#### 4.3.3. Histología en plantas de Babaco con inoculaciones inducidas de *Trichoderma* spp., (ECM6), bajo invernadero

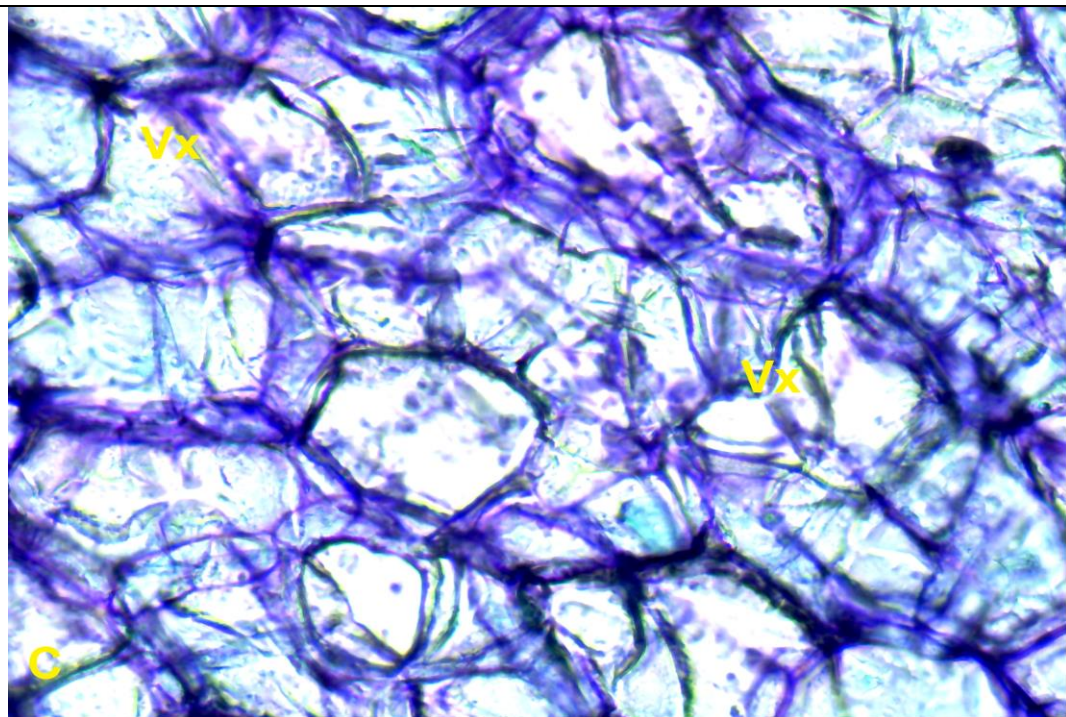
En los tejidos inoculados con *Trichoderma* se observa la vigorosidad de los tejidos vegetales no se observa ninguna alteración en el cuello y base de la raíz, ni en el floema, vasos xilémicos. La colonización implica una habilidad de reconocimiento y adherencia a la raíz del Babaco (Figura 9A, B y C).



**Figura 9.** A) Tejidos inoculados con *Trichoderma* spp. (ECM6), Fl Floema y Cp Células parenquimatosas (4x) Loja, 2015.



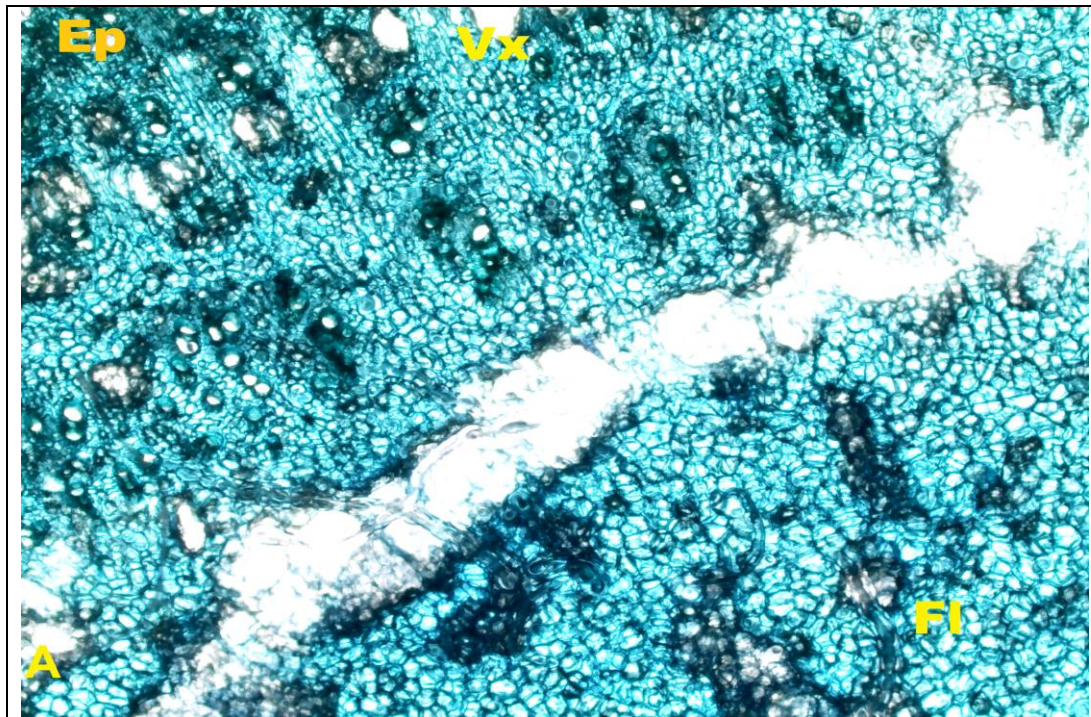
**Figura 9. B)** Tejidos inoculados con *Trichoderma* spp. (ECM6), **Fl** Floema y **Cp** Células parenquimatosas (10x) Loja, 2015.



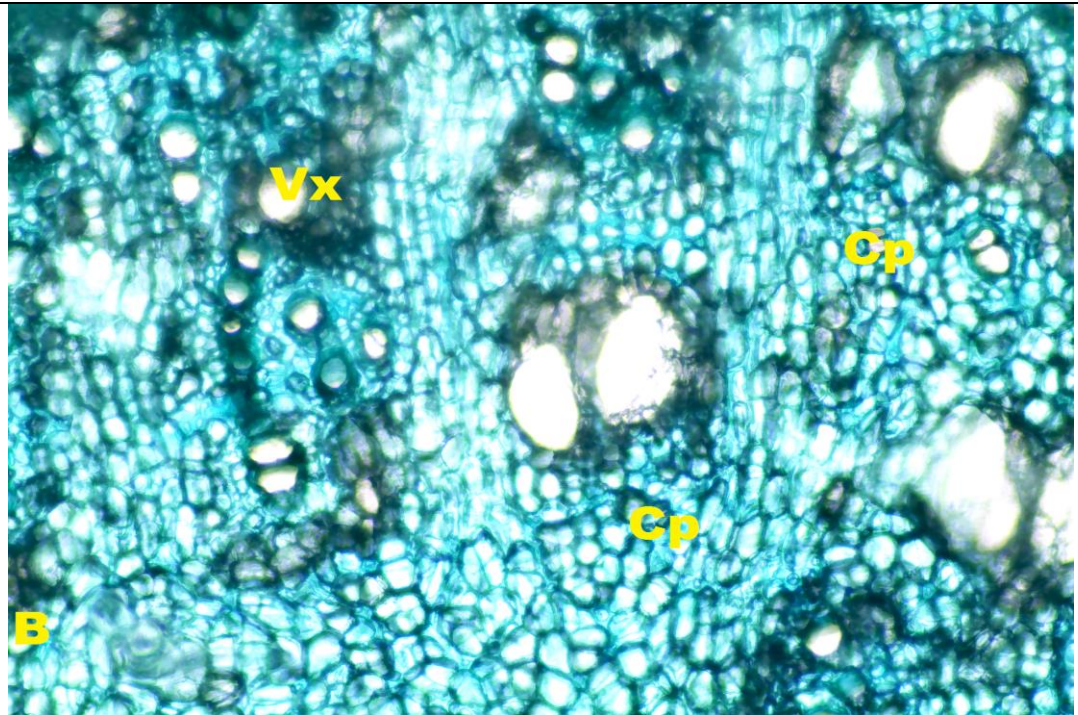
**Figura 9. C)** Tejidos inoculados con *Trichoderma* spp. (ECM6), **Vx** Vasos del xilema (40x) Loja, 2015.

#### 4.3.4. Histología en plantas de Babaco con inoculaciones inducidas de *Trichoderma* spp (ECM6) y *Fusarium oxysporum* (QUI2 y CHA1), bajo invernadero

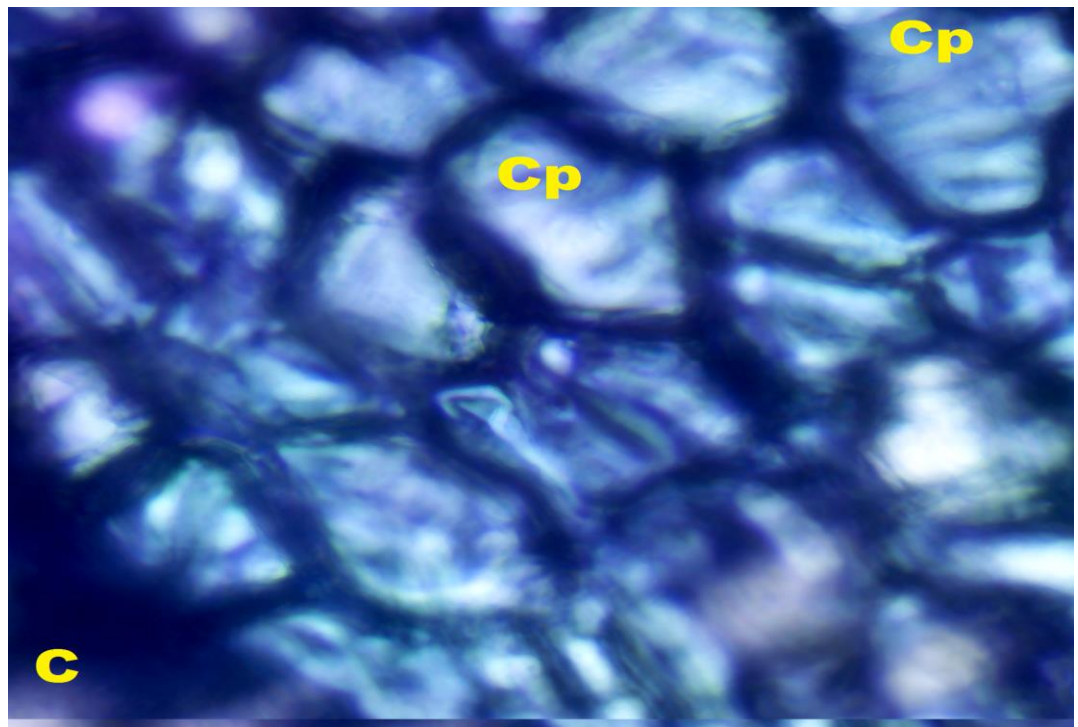
El desarrollo de *Fusarium* se encuentra restringido en la base del tallo y en las capas externas de las raíces el engrosamiento y oclusión de los espacios intercelulares que impiden la entrada de *Fusarium* (Figura 10A, B, C, D, E y F).



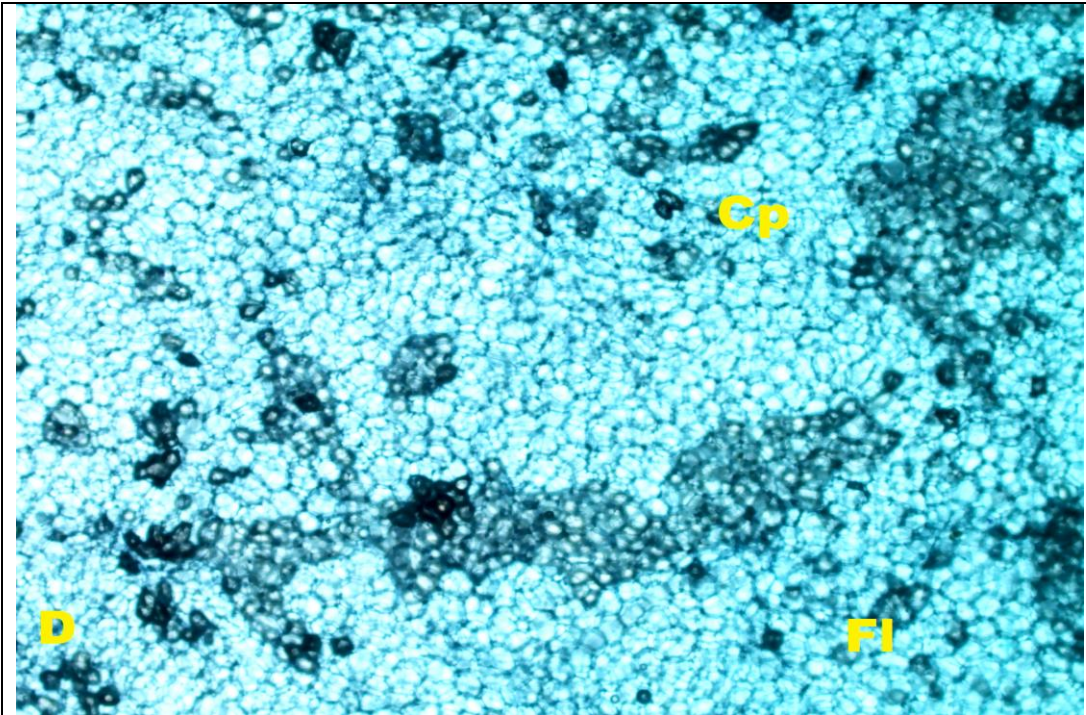
**Figura 10.** A) Tejidos inoculados con *Fusarium oxysporum* (patogenicidad alta) + *Trichoderma* spp. (QUI2+ ECM6), **Fl** Floema, **Vx** Vasos del xilema y **Ep** Epidermis (4x) Loja, 2015.



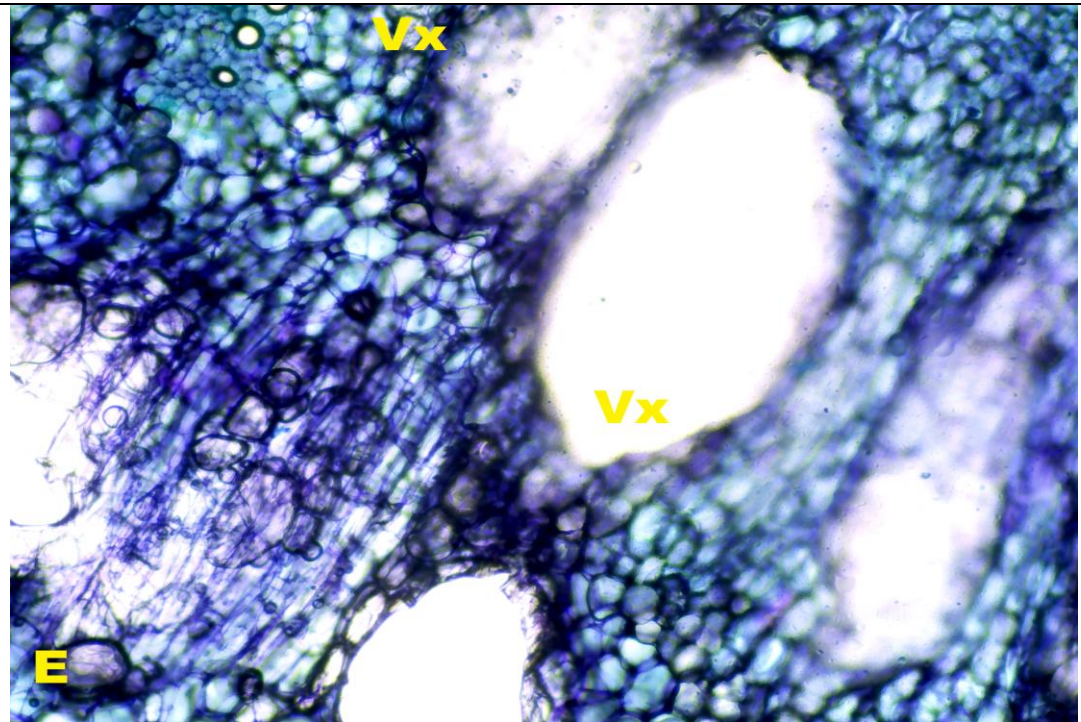
**Figura 10. B)** Tejidos inoculados con *Fusarium oxysporum* (patogenicidad alta) + *Trichoderma* spp. (QUI2+ ECM6), **Cp** Células parenquimatosas y **Vx** Vasos del xilema, (10x) Loja, 2015.



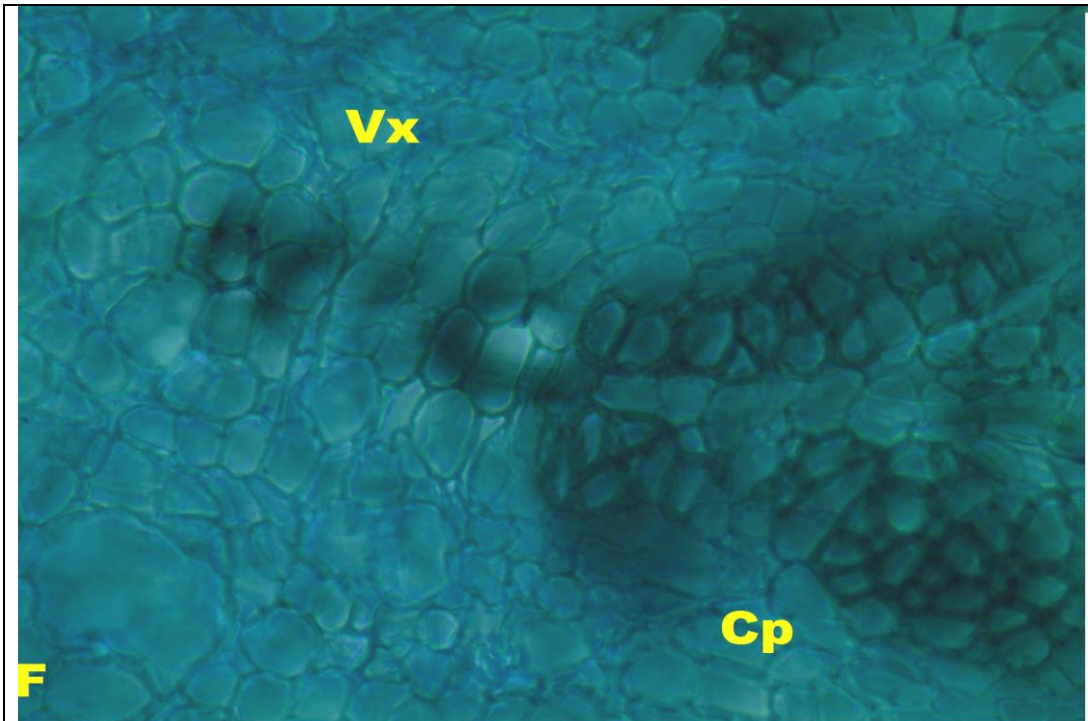
**Figura 10. C)** Tejidos inoculados con *Fusarium oxysporum* (patogenicidad alta) + *Trichoderma* spp. (QUI2+ ECM6), **Cp** Células parenquimatosas (40x) Loja, 2015.



**Figura 10. D)** Tejidos inoculados con *Fusarium oxysporum* (patogenicidad baja) + *Trichoderma* spp., **Fl** Floema y **Cp** Células parenquimatosas (4x) Loja, 2015.



**Figura 10. E)** Tejidos inoculados con *Fusarium oxysporum* (patogenicidad baja) + *Trichoderma* spp., **Vx** Vasos del xilema (10x) Loja, 2015.



**Figura 10.** F) Tejidos inoculados con *Fusarium oxysporum* (patogenicidad baja) + *Trichoderma* spp. **F**l Floema, **Cp** Células parenquimatosas y **Vx** Vasos del xilema (40x) Loja, 2015.

## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1. Evaluar la Incidencia y Severidad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) en la provincia de Loja**

No existen reportes algunos sobre el estudio de la incidencia y severidad de la MVB en la provincia de Loja a nivel de campo abierto o invernadero para poder realizar las respectivas comparaciones, no obstante, los incrementos de los niveles de incidencia y severidad de la enfermedad en el desarrollo de la Marchitez Vascular del Babaco, están estrechamente relacionados con la temperatura y humedad relativa. Las diferencias de incidencia y severidad en los sitios de estudio se deben a las condiciones de cada uno de los factores. Además, La humedad del suelo, las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa), la textura del suelo, vegetación, la topografía terreno y cantidad de inóculo (clamidósporas) en el suelo; son las condiciones favorables para el incremento de la incidencia y severidad de la Marchitez Vascular del Babaco (Agrios, 2005).

En el cantón Loja, los barrios Amable María y El Alumbre y de la parroquia Chantaco, sector El Carmelo y Reymincha, estos lugares están situados a una altitud que varía entre 2200 a 2723 msnm, con una temperatura que va de 8 a 21°C y la humedad relativa es del 74 al 80%. En cambio el cantón Saraguro en los sectores de Cochapamba, Quisquinchir, Las Lagunas y Tuncarta, estos lugares se encuentran a una altitud de 2500 a 3800 msnm, con una temperatura que oscila de 8 a 27°C y una humedad relativa de 80 a 88% (Torres y Duche, 2012; Castillo, 2012). Según la observación visual de los síntomas y la aplicación de la escala de evaluación de la MVB, en el cantón Loja la incidencia alcanza un promedio de 96% y severidad del 65%. En comparación con el cantón Saraguro, que tuvo una incidencia promedio de 82% y una severidad de 44%.

La explicación que se le puede atribuir al incremento de la incidencia y severidad en el cantón Loja, sería a que los cultivos de Babaco evaluados se encontraban en campo abierto sin ninguna medida de control para la MVB. En cambio, en el cantón Saraguro el sistema de cultivo de Babaco se encuentra bajo invernadero y con la aplicación de productos químicos para controlar las plagas y enfermedades, especialmente la MVB lo que haya podido contribuir a disminuir en algo la enfermedad. No obstante, Gonzales *et al.* (2012), y

Garcés de la Granada *et al.* (2001), afirman que las especies del genero *Fusarium* se desarrollan a una temperatura de 20 a 25°C y una humedad relativa alta, para poder infectar los tejidos de las plantas y puedan germinar sus estructuras reproductivas

### **5.2.Determinar el biocontrol de *Fusarium* spp., en interacción con *Trichoderma* spp., causantes de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante pruebas de inoculación bajo condiciones controladas**

De acuerdo al análisis de los resultados en el biocontrol de la MVB, no se encontraron diferencias significativas en los primeros periodos de evaluación (día 1, 5, 10, y día 15). Aparentemente hubo un efecto de *Trichoderma* sobre *Fusarium* causante de la MVB. Sin embargo, existen diferencias significativas a partir del periodo de evaluación a 20, 25, 30, 35 y 40 días de evaluación. Posiblemente el aparente efecto benéfico del hongo *Trichoderma* se debe como señala a Cueva (2007), que las aplicaciones de *Trichoderma* spp inducen un sistema de defensa de la planta de Babaco en contra de *Fusarium* el cual tiene un efecto inhibitorio en la reducción de la enfermedad de la MVB.

Los resultados en este trabajo de investigación, resaltan los bajos valores de severidad de la enfermedad observados en las plantas tratadas con *Trichoderma* spp., se ha reportado que especies del genero *Trichoderma* (*Trichoderma koningii*, *Trichoderma album*), pueden favorecer el crecimiento de las plantas cuya rizósfera colonizan (Cueva, 2007). Además, varias especies de *Trichoderma* son capaces de competir y desarrollar su micelio alrededor de las hifas del patógeno previniendo su penetración (Druzhinina *et al.*, 2006; Druzhinina *et al.*, 2011; Belayneh *et al.*, 2013). Asimismo pueden promover cultivos sanos debido a diferentes mecanismos, tales como la supresión de algunos patógenos mediante la producción de antibióticos, un estímulo de las defensas de las plantas hospederas previo a la infección y la mayor absorción de nutrientes (Anjaiah *et al.*, 2001; Harman *et al.*, 2012). Posiblemente, la conjunción de estos mecanismos permitió que se propiciara un crecimiento vigoroso de las plantas y una mayor resistencia a la infección por *Fusarium* spp., así como una mayor fitoprotección de las plantas inoculadas con el patógeno y sin medidas de control.



Hay estudios en otros cultivos y con otros patógenos realizados por González-Cárdenas *et al.*, (2005) reportaron que la cepa de *Trichoderma* spp., aislada de Veracruz, México resultó efectiva para controlar a *Fusarium oxysporum* causante del *damping-off* en plántulas de papaya. Asimismo, tenemos los estudios realizados por Guédez *et al.*, (2012) quienes utilizaron seis cepas de *Trichoderma harzianum* en el control in vitro de un complejo de hongos (*Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum*) causantes de pudriciones radiculares en plántulas de tomate logrando disminuir la incidencia en los tres microorganismos patógenos en un rango comprendido de 71 a 80%. Todos los estudios citados demuestran que los diferentes aislados de *Trichoderma* son promisorios para el control de microorganismos fitopatógenos y además, estimulan el crecimiento y la resistencia sistémica adquirida en las plantas.

### **5.3. Realizar estudios histológicos de la interacción *Fusarium-Trichoderma-Babaco* en diferentes estadios de crecimiento de la planta**

#### **5.3.1. Histología en plantas sanas de Babaco y en plantas con infecciones inducidas de *Fusarium oxysporum* (QUI2 y CHA1), bajo invernadero**

En los estudios histológicos, se realizaron cortes transversales de las raíces y se comparó la integridad de los tejidos en las plantas inoculadas y sin inocular. En las plantas inoculadas con las cepas de *Fusarium oxysporum* (QUI2 y CHA1), en las imágenes obtenidas se aprecian una abundante colonización inter e intracelular de micelio de *Fusarium*. Es así que, en el cuello de la raíz los vasos del xilema mostraron una apreciable colonización por parte de hifas del patógeno, así como la producción de geles. Ortiz (2012), afirma que la formación de geles es como mecanismo de defensa histológico de la planta y la formación de geles podría limitar la diseminación del patógeno y prevenir la oclusión de los vasos xilémicos. Asimismo, Herrera y Mayea (1994), afirman que la formación de geles y gomas responden a una infección vascular de los patógenos que causan marchitamientos vasculares (en este caso *Fusarium oxysporum*), además afirman que los geles están compuestos por sustancias peptínicas y celulíticas, por último en el lugar donde estaban los geles aparecen más tarde las gomas, probablemente por una reacción de los geles con pigmentaciones melanoideas asociados a la decoloración vascular.

Además las células del parénquima fueron colonizadas y mostraron una reducción de la cantidad de los amiloplastos. Como sabemos que los amiloplastos cumplen la función de almacenar productos como el almidón, proteínas o lípidos y también es el orgánulo que realiza la función fotosintética en presencia de luz (Herrera y Mayea, 1994; Agrios, 2005). Ortiz (2012) y Triana (2009) afirman que la reducción del número de los amiloplastos de las células del parénquima puede ser un mecanismo mediante el cual la planta agota las reservas de carbohidratos presentes en los amiloplastos, ante el estrés producido por efecto del patógeno.

La coloración con azul de toluidina y verde malaquita permitió observar posiblemente las hifas del patógeno, de esta manera de color verde se tiñeron las células del parénquima y el resto de tejidos vegetales y de color azul las hifas del patógeno (Figura 6B). Además se observan una desorganización de las células del parénquima y esto podría ocasionar la hipertrofia del xilema. Los resultados obtenidos se asemejan en parte a los obtenidos por Ortiz (2012) y por García (2012), debido a que ellos obtuvieron resultados más acertados utilizando muestras de tejido vegetal incrustado en parafina. En cambio, en este proyecto de tesis se realizó las preparaciones de tejido vegetal en fresco.

### **5.3.2. Histología en plantas de Babaco con inoculaciones inducidas de *Trichoderma* spp., (ECM6) y con inoculaciones inducidas de *Trichoderma* spp (ECM6) y *Fusarium oxysporum* (QUI2 y CHA1), bajo invernadero.**

El empleo de agentes de control biológicos definidos como biofungicidas son los que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas en los sistemas productivos, es una alternativa viable para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Hermosa, 2012; Gajera *et al.*, 2013).

El hongo *Trichoderma* sp., es un habitante natural del suelo y puede desempeñarse como saprófito o como parásito de otros hongos (Hernández *et al.* 2011). Es ampliamente conocido por su conducta antagonista y es utilizado para biocontrol, debido a su ubicuidad,

a su facilidad para ser aislado y cultivado, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no ataca plantas. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno están fundamentalmente asociados a competición directa por el espacio o por los nutrientes, producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Hoyos *et al.*, 2008; Körmöczi *et al.*, 2013).

Los resultados de esta investigación, indican que la cepa de *Trichoderma*, se puede observar que los signos del patógeno se encuentran restringidos desde la base del tallo hacia las capas externas de la raíz, pero no hay información científica que sustente este aspecto descrito con anterioridad (Metcalf and Wilson, 2001; Mutawila *et al.* 2011). Al realizar inoculaciones de *Trichoderma* frente a *Fusarium oxysporum* desarrollaron una respuesta histológica de resistencia sistémica inducida esta fue más notoria hacia la zona del cuello, posiblemente por ser una zona de transición crítica en el avance de la colonización hacia el resto de la planta (Caballero, 2011).

Además, la restricción del patógeno en la base del tallo y capas externas de la raíz, se debe posiblemente a que algunos compuestos químicos como las malforminas están involucrados directamente con el desarrollo de la enfermedad, sin la presencia masiva del hongo en el interior de los tejidos según Ortiz (2012). De acuerdo con Kumar *et al.* (2011), las malforminas estimulan la producción de etileno, el cual a la vez causa desbalance hormonal e induce síntomas de malformación (proliferación).

## 6. CONCLUSIONES

- La incidencia de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) en la provincia de Loja, se encuentra en un rango comprendido de 66,7 al 100%.
- La cepa de *Trichoderma* sp., mostró gran capacidad de biocontrol, frente a las dos cepas de *Fusarium* sp., reduciendo su severidad en un rango comprendido de 3,6 a 10,7% bajo condiciones controladas.
- El control biológico con *Trichoderma* spp., para la Marchitez Vascular del Babaco, permitió la sobrevivencia de las plantas aún en presencia del fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.
- En los estudios histológicos realizados en plantas de Babaco inducidas de *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum*, las cepas QUI2+ ECM6 y CHA1+ ECM6, fueron las que presentaron tejidos vegetales con menor daño.

## **7. RECOMENDACIÓN**

- Realizar estudios histológicos con material vegetal incrustado en parafina mediante el uso de mutantes fluorescentes y con la utilización del microscopio confocal, en el cultivo de Babaco bajo condiciones controladas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Agrios G. 2005. Plant Pathology. (5th ed.) Published Elsevier. United States of America. 948 p.
2. Ampuero, P. 2004. Elaboración de mermelada de Babaco como producto no tradicional de exportación al mercado Europeo. Tesis de Economista con Mención en Gestión Empresarial Especialización Marketing. Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.
3. Andrade, A.; Vivanco, G. 2002. Estudio de Factibilidad para la producción y exportación de Babaco a Canadá. Tesis de Ingeniería Comercial. Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador. 151 p.
4. Armijos, W. & Salinas D. 2014. Identificación taxonómica y caracterización molecular de los agentes causales de la Marchitez Vascular del Babaco *Vasconcellea heilbornii* Badillo. var. *pentagona*, en los cantones Loja y Saraguro. Tesis. Universidad Nacional de Loja. Loja- Ecuador.
5. Argotti, E.; Cazar, M.; Motte, E.; Cedeño, V. 2011. Análisis molecular de la región ITS de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez vascular de *Vasconcellea heilbornii* y *Solanum quiotense* en Ecuador. Revista ESPE Ciencia y Tecnología. 3(1): 25 – 36.
6. Anjaiah, V.; Thakur, R & Rao, V. 2001. Molecular Diversity in *Trichoderma* Isolates with Potential for Biocontrol o *Aspergillus flavus* Infection in Groundnut. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India.
7. Asociación De Agrónomos Indígenas De Cañar (AAIC). 2003. El cultivo de Babaco en invernadero. Editorial Abya Yala. Quito, Ecuador. 45 p.

8. Asturizaga, A.; Ollgaard, B. & Balsle, H. 2006. Frutos comestibles. Botánica Económica de los Andes Centrales. Instituto de Ecología, Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia.
9. Alexopoulos, C.; Mims C. & Blackwell M. 1996. Introductory Micology. John Wiley & Sons. 4a edición. EUA.
10. Ávila M. 2010. Situación fitosanitaria y evaluación de productos alternativos y convencionales para manejar *Fusarium oxysporum* en *Vasconcella sp.* Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del Azuay. 89 p.
11. Badillo, V.M. 1983. Caricaceae. In: Harling, G. & Sparre, B. (eds.). Flora of Ecuador. No. 20. Göteborg University, Göteborg, Sweden, pp. 26-47.
12. Badillo, V.M. 1997. Neotipificación de *Carica pubescens* Lenné et Koch y de *Carica quercifolia* (St. Hil.) Hieron. y nuevos registros de la familia para Ecuador. *Ernstia*, 6(4): 201-205.
13. Badillo, V.M. 2000. *Carica L.* vs. *Vasconcella St.-Hil.* (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10(2): 74-79.
14. Badillo, V.M. 2001. Nota correctiva *Vasconcella St. Hill.* Y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11(1): 75-76.
15. Belayneh-Mulaw, T.; Druzhinina, I. & Atanasova, L. 2013. Novel Endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from Healthy *Coffea arabica* Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomycosis. Article *Diversity* 2013, 5, 750-766; doi:10.3390/d5040750.

16. Bravo, D. 2005. Proyecto de factibilidad para producción y exportación de Babaco al mercado Alemán entre 2006-2015. Universidad Tecnológica Equinoccial. Quito. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniera en Comercio Exterior e Integración. 97 p.
17. Caballero A. 2011. Uso de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) raza tropical 1 en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA). Tesis para obtener el grado de Magister *Scientiae* en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical De Investigación y Enseñanza. Costa Rica. 105 p.
18. Castillo, T. 2012. Monografía del Cantón Saraguro de la Provincia de Loja. Trabajo previo a la obtención del título de Ingeniera en Administración de Empresas Turísticas y Hoteleras. Universidad Técnica Particular de Loja. 233p.
19. Castellanos, G.; Jara, C & Mosquera, G. 2011. Guías Prácticas de Laboratorio para el Manejo de Patógenos del Frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Publicación CIAT No. 375. ISBN 978-958-694-110-5. 242 p.
20. Caguana, M. 2003. El cultivo de Babaco en invernadero. Editorial Abya Yala. Quito, Ecuador. 45 p.
21. Chérif M y Benhamou N. 1990. Cytochemical Aspects of Chitin During the Parasitic Action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersisi*. Université Laval. Canadá.
22. CINFA. 2014. Centro Integrado de Geomática Ambiental. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.



23. Cotacachi, R. 2013. Evaluación agronómica del desarrollo de plantas de babaco (*Carica pentágona*) con tres dosis de bioestimulante radicular orgánico y tres combinaciones de sustratos en la parroquia de Yaruquí, Provincia De Pichincha. Universidad Estatal De Bolívar. Tesis De Grado Previo A La Obtención Del Título de Ingeniera Agrónoma.160 p.
24. Cooke, B.; Gareth D. & Kaye, B. 2006. The Epidemiology of Plant Diseases. Second edition. Published by Springer. ISBN-13 978-1-4020-4580-6 (PB).
25. Coyago, R.; León, F. & Patiño, V. 2010. Evaluación del comportamiento del babaco (*Vasconcella x heilbornii var. pentagona*) en tres tipos de alturas de podas en plantas de seis años de producción en la parroquia Pulán, Cantón Paute, Provincia Del Azuay. Universidad Politécnica Salesiana. Tesis previa a la obtención del Titulo de Ingeniero Agropecuario Industrial. 105 p.
26. Cueva D. 2007. Producción de inoculantes a base de *Trichoderma* spp. Para el control de *Fusarium oxysporum sp. caricae* en injertos de babaco (*Vasconcella heilbornii cv. babaco*). Tesis de Ingeniería Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejército-ESPE. Sangolquí-Quito-Ecuador. 114 p.
27. Chaverri, P. & Samuels, G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores*. Agricultural Research Service, Systematic Botany and Mycology Laboratory, U.S.A. ISBN 90-70351-51-X.
28. Druzhinina, I.; Seidl, V.; Herrera, E.; Horwitz, B.; Kenerle C, Monte, E.; Mukherjee, K. & Kubicek, C.2011. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology. Volume 9 October.
29. Druzhinina, I.; Kopchinskiy, G. & Kubicek, 2012. B. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience 47:55–64 © The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo. DOI 10.1007/s10267-006-0279-7.

30. Ezziyyani, M.; Pérez, C.; Sánchez, A.; Requena, M. & Candela M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Anales de Biología 26: 35-45.
31. Fabara, J.; Bermeo N. & Barberan, C. 1985. Manual del Cultivo de Babaco. Primera edición. Universidad Técnica de Ambato. 105 p.
32. Gajera, H.; Domadiya, R.; Patel,S.; Kapopara, M.& Golakiya.B. 2013. Molecular mechanism of Trichoderma as bio-control agents against phytopathogen system. *Department of Biotechnology, College of Agriculture, Junagadh Agricultural University, Junagadh – 362 001, Gujarat, India. Vol. 1, No. 4 (2013): 133-142. ISSN: 2320-2246.*
33. Galarza, L. 2011. Aislamiento e Identificación Molecular de *Trichoderma* spp. Tesis de Grado Previa la Obtención del Título De: Magister en Biotecnología Agrícola. Escuela Superior Politécnica del Litoral. 139 p.
34. Garcés De Granada, C.; Orozco De Amézquita M.; Bautista, R. 2001. *Fusarium oxysporum*: El Hongo Que Nos Falta Conocer. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Acta Biológica Colombiana, Vol. 6 No. 1.
35. García P. 2011. Evaluación de la tolerancia de cinco accesiones de Vasconcellas a *Fusarium sp.* , como posible portainjertos para Babaco (*Vasconcellea x heilborni*) bajo cubierta plástica en la Estación Experimental del Austro de INIAP. Trabajo de Investigación Previa a la obtención del Grado Académico de Magister en Gestión de la Producción de Flores y Frutas Andinas para Exportación. Universidad Técnica de Ambato. 75 p.

36. Guédez, C.; Cañizalez, L.; Castillo, C. & Olivar, R. 2012. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2012; 32:44-49.
37. González, I.; Arias, Y. & Peteira, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fitopatología, Dirección de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba. Rev. Protección Veg. Vol. 27 No. 1 (2012): 1-7.
38. Guzmán-Piedrahita, O., Castaño-Zapata, J., Villegas-Estrada, B. 2009. Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico. Revista Agron 17(2): 7 – 24.
39. Hernández, J.; Sánchez M.; García, J.; Mayek, N.; González, J.; Quiroz, J. 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del noreste de México. 95 p.
40. Harman, G.; Herrera, A.; Horwitz, B. & Lorito, M. 2012. Special issue: Trichoderma—from Basic Biology to Biotechnology. Microbiology (2012), 158, 1–2. DOI 10.1099/mic.0.056424-0. 18 p.
41. Hibar, K. 2007. Induction of Resistance in Tomato Plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Trichoderma* spp. Centre Regional des Recherches en Horticulture et Agriculture Biologique. Tunisian Journal of Plant Protection 2: 47-58
42. Hull, R. 2009. Comparative Plant Virology. Science & Technology books. Department of Disease and Stress Biology John Innes Centre Norwich, UK.

43. Hoyos- Carvajal, L.; Aguilar, M.; Melgarejo, L. 2008. Respuesta Fisiológica de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims) frente al ataque por *Fusarium* spp. Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 23 p.
44. Jácome, J. 2011. Evaluación de tres mezclas de sustratos y tres fitohormonas en enraizamiento de brotes laterales de Babaco (*Carica pentagona*), barrio Pinllocruz, cantón Mejía, provincia de Pichincha. Tesis Previa a la Obtención del Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador. 96 p.
45. Kyndt, T. 2005. Molecular Genetic Analysis Of The Genera *Carica* L. And *Vasconcellea* Saint Hilaire (Caricaceae). Thesis submitted in fulfilment of the requirement for the degree of doctor (Phd.) in applied biological sciences. Faculteit bio-ingenieurswetenschappen.
46. Körmöczi, P.; Danilović, G.; Manczinger, L.; Jovanović, L.; Panković, D; Vágvölgyi & Kredics, L. 2013. Species Composition Of *Trichoderma* Isolates From The Rhizosphere Of Vegetables Grown In Hungarian Soils. Fresenius Environmental Bulletin. by PSP Volume 22 – No 6. 2013.
47. Leslie, F.; Summerell, B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Published, Blackwell. Manhattan, United States of America. 387 p.
48. López, R. 2011. Detección y Cuantificación de *Trichoderma harzianum*, y Evaluación de su Actividad Biocontrol frente a la Fusariosis Vascular del Melón mediante la Aplicación de Herramientas Moleculares. Universidad de Alicante. Departamento de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos. CEBAS-CSIC. 162 p.

49. Martínez, C. 2010. Etiología e Incidencia de Hongos Asociados al Manchado de Cálices de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis presentada como requisito parcial para obtener El Grado de Maestra En Ciencias. Campus Montecillo Postgrado de Fitosanidad Fitopatología. 101 p.
50. Metcalf, D. and Wilson, R. 1999. Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion roots and the spatial relationships of pectinases in the infection process. *Plant Pathology* (1999) 48, 445-452.
51. Michel-Aceves. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp euascomycetes: Hypocreales), su Antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). Universidad De Colima. México. 176 p.
52. Nelson, P; Toussoun, T. & Marasas, W. 1983. *Fusarium* spp. An illustrated manual for identification. London. Pennsylvania State University Press.
53. Mutawila, C.; Fourie, P.; Halleen, F., & Mostert, L. 2011. Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeoconiella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch South Africa. *Phytopathol. Mediterr.* (2011) 50 (Supplement), S46–S60.
54. Núñez, D. 2008. Optimización del proceso de elaboración de pulpa de babaco (*Carica pentagona*), con incorporación de su corteza y maximizando la retención de ácido ascórbico. Tesis de Ingeniería en Industrias Agropecuarias. Área Biológica. Universidad Técnica Particular De Loja, Ecuador. 102 p.
55. Ochoa, J. & Fonseca G. 2000. First Report of *Fusarium* Wilt of Babaco (*Carica × heilbornii* var. *pentagona*) in Ecuador. *Revista Plant Disease*. 84(2): 190.

56. O'Brien, C. 2010. Marker-Assisted Breeding for Papaya Ringspot Virus Resistance in *Carica papaya L.* University of Queensland Griffith School of Environment Science, Environment, Engineering and Technology Griffith University.
57. Ortiz, H. 2012. Etiología de enfermedades asociadas a fusariosis en el cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en la región del Sumapaz. Tesis de Magister en Ciencias Agrarias con Énfasis en Fitopatología. Universidad Nacional de Colombia. 108 p.
58. Robles, A. 2011. Estudio de las interacciones patógeno-patógeno, que se establecen durante el desarrollo de la enfermedad de la marchitez vascular en el babaco (*Vasconcellea x. heilbornii* var. pentagona). Proyecto de investigación; componente patógeno-patógeno. Universidad Nacional de Loja; Centro de Biotecnología. Ecuador. 38 p.
59. Rojas-Triviño, A. 2011. Conceptos y Práctica de Microbiología General. Editorial: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Palmira, Colombia. 161 p.
60. Robles-Carrión, A.; Salinas-Serrano, D.; Armijos-Armijos, W.; Sánchez-Rodríguez, A y Torres-Gutiérrez, R. 2014. Estudio de la variabilidad morfológica en aislados fúngicos asociados con la enfermedad de la Marchitez Vascular Del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*) en Loja, Ecuador. Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja.
61. Scheldeman, X. 2002. Distribution and potential of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador. Thesis of Doctor in Applied Biological Sciences. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences. Ghent University, Belgium. 190 p.
62. Sarango, S. y Palta, M. 2011. Biocontrol de *Fusarium* spp. en el cultivo de tomate de mesa con *Trichoderma* spp. Tesis de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador. 96 p.

63. Samuels, G.; Ismaiel, I.; Mulaw, T.; Szakacs, G.; Druzhinina, L. & Jaklitsch, M. 2012. The Longibrachiatum Clade of Trichoderma: a revision with new species. Paper: Fungal Diversity (2012) 55:77-108 DOI 10.1007/s13225-012-0152-2
64. Triana, J. 2009. Evaluación de la Respuesta de Variedades y Líneas Experimentales de Clavel (*Dianthus caryophyllus*) a la Inoculación Artificial con *Fusarium oxysporum* f. sp *dianthi* Bajo Condiciones de Invernadero. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Militar .Nueva Granada. Bogota-Colombia.102 p.
65. Tobar, M. 2008. Análisis de competitividad de los productores de babaco de San Pablo de Tenta (Saraguro, Loja) con enfoque de agrocadena. Tesis Magister en Estudios Sociales y Globales. Programa de Estudios Latinoameric anos Mención en Estudios Agrarios Universidad Andina Simón Bolívar, Ecuador. 109 p.
66. Torres, J. y Duche, G. 2012. Monografía del cantón Loja, provincia de Loja. Trabajo de fin de titulación de Hotelería Y Turismo. Universidad Técnica Particular de Loja. 279 p.
67. Uzcátegui, C. 2007. Estudio de factibilidad para la implementación de una empresa dedicada a la industrialización del babaco. Tesis de Ingeniería Empresarial. Escuela Politécnica Nacional, Ecuador. 185 p.
68. Volcy, Ch. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Revisión Agronomía Colombiana, vol. 26, núm. 1, 2008, pp. 107-115 Universidad Nacional de Colombia.

69. Veintimilla, J. 2007. Escala de severidad interna y externa in Producción de inoculantes a base de *Trichoderma* spp. para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae* en injertos de Babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco). por Cueva, R. 2007. Escuela Politécnica del Ejército-ESPE. Informe técnico del proyecto de investigación presentado como requisito para optar el título de Ingeniería Agropecuaria. Sangolquí-Ecuador.
70. Villa, V. 2015. Cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la rizósfera del Babaco (*Vasconcellea herilbornii* var. pentagona) en el sur del Ecuador. Tesis de Ingeniería Agronómica Universidad Nacional de Loja. Loja- Ecuador. 95 p.





**Anexo 2.** Cuento de estructuras conidiales de las cepas de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* spp.

<b>PARTE SUPERIOR</b>									
<b>MUESTRA: CHy1</b>									
<b>FECHA:22-07-2015</b>									
<b>Cuadrante 1</b>		<b>Cuadrante 2</b>		<b>Cuadrante 3</b>		<b>Cuadrante 4</b>		<b>Cuadrante 5</b>	
<b>1.1</b>	17	<b>2.1</b>	27	<b>3.1</b>	17	<b>4.1</b>	16	<b>5.1</b>	15
<b>1.2</b>	19	<b>2.2</b>	22	<b>3.2</b>	22	<b>4.2</b>	19	<b>5.2</b>	19
<b>1.3</b>	24	<b>2.3</b>	18	<b>3.3</b>	19	<b>4.3</b>	23	<b>5.3</b>	17
<b>1.4</b>	16	<b>2.4</b>	23	<b>3.4</b>	24	<b>4.4</b>	20	<b>5.4</b>	20
<b>1.5</b>	18	<b>2.5</b>	25	<b>3.5</b>	20	<b>4.5</b>	18	<b>5.5</b>	16
<b>1.6</b>	23	<b>2.6</b>	20	<b>3.6</b>	23	<b>4.6</b>	23	<b>5.6</b>	18
<b>1.7</b>	27	<b>2.7</b>	24	<b>3.7</b>	18	<b>4.7</b>	21	<b>5.7</b>	23
<b>1.8</b>	22	<b>2.8</b>	19	<b>3.8</b>	15	<b>4.8</b>	19	<b>5.8</b>	21
<b>1.9</b>	21	<b>2.9</b>	21	<b>3.9</b>	27	<b>4.9</b>	19	<b>5.9</b>	19
<b>1.10</b>	19	<b>2.10</b>	23	<b>3.10</b>	23	<b>4.10</b>	23	<b>5.10</b>	19
<b>1.11</b>	23	<b>2.11</b>	20	<b>3.11</b>	21	<b>4.11</b>	24	<b>5.11</b>	22
<b>1.12</b>	18	<b>2.12</b>	18	<b>3.12</b>	19	<b>4.12</b>	20	<b>5.12</b>	18
<b>1.13</b>	25	<b>2.13</b>	25	<b>3.13</b>	22	<b>4.13</b>	22	<b>5.13</b>	20
<b>1.14</b>	22	<b>2.14</b>	23	<b>3.14</b>	18	<b>4.14</b>	18	<b>5.14</b>	23
<b>1.15</b>	20	<b>2.15</b>	20	<b>3.15</b>	24	<b>4.15</b>	16	<b>5.15</b>	17
<b>1.16</b>	23	<b>2.16</b>	25	<b>3.16</b>	22	<b>4.16</b>	19	<b>5.16</b>	15
<b>TOTAL</b>	<b>337</b>	<b>TOTAL</b>	<b>353</b>	<b>TOTAL</b>	<b>344</b>	<b>TOTAL</b>	<b>320</b>	<b>5.17</b>	20
								<b>5.18</b>	19
								<b>5.19</b>	16
								<b>5.20</b>	22
								<b>5.21</b>	18
								<b>5.22</b>	20
								<b>5.23</b>	22
								<b>5.24</b>	19
								<b>5.25</b>	17
								<b>TOTAL</b>	<b>475</b>

Anexo 2. Continuación...

<b>PARTE SUPERIOR</b>									
<b>MUESTRA: SAR2</b>									
<b>FECHA:22-07-2015</b>									
<b>Cuadrante 1</b>		<b>Cuadrante 2</b>		<b>Cuadrante 3</b>		<b>Cuadrante 4</b>		<b>Cuadrante 5</b>	
<b>1.1</b>	13	<b>2.1</b>	22	<b>3.1</b>	18	<b>4.1</b>	21	<b>5.1</b>	22
<b>1.2</b>	16	<b>2.2</b>	16	<b>3.2</b>	22	<b>4.2</b>	17	<b>5.2</b>	19
<b>1.3</b>	23	<b>2.3</b>	19	<b>3.3</b>	21	<b>4.3</b>	19	<b>5.3</b>	18
<b>1.4</b>	14	<b>2.4</b>	23	<b>3.4</b>	19	<b>4.4</b>	23	<b>5.4</b>	23
<b>1.5</b>	17	<b>2.5</b>	17	<b>3.5</b>	22	<b>4.5</b>	21	<b>5.5</b>	17
<b>1.6</b>	15	<b>2.6</b>	19	<b>3.6</b>	18	<b>4.6</b>	20	<b>5.6</b>	21
<b>1.7</b>	19	<b>2.7</b>	18	<b>3.7</b>	23	<b>4.7</b>	18	<b>5.7</b>	20
<b>1.8</b>	17	<b>2.8</b>	21	<b>3.8</b>	20	<b>4.8</b>	22	<b>5.8</b>	19
<b>1.9</b>	20	<b>2.9</b>	17	<b>3.9</b>	24	<b>4.9</b>	19	<b>5.9</b>	23
<b>1.10</b>	22	<b>2.10</b>	20	<b>3.10</b>	19	<b>4.10</b>	20	<b>5.10</b>	25
<b>1.11</b>	16	<b>2.11</b>	23	<b>3.11</b>	21	<b>4.11</b>	20	<b>5.11</b>	19
<b>1.12</b>	19	<b>2.12</b>	19	<b>3.12</b>	18	<b>4.12</b>	17	<b>5.12</b>	18
<b>1.13</b>	21	<b>2.13</b>	18	<b>3.13</b>	23	<b>4.13</b>	23	<b>5.13</b>	20
<b>1.14</b>	22	<b>2.14</b>	24	<b>3.14</b>	24	<b>4.14</b>	22	<b>5.14</b>	16
<b>1.15</b>	17	<b>2.15</b>	22	<b>3.15</b>	20	<b>4.15</b>	18	<b>5.15</b>	19
<b>1.16</b>	20	<b>2.16</b>	20	<b>3.16</b>	23	<b>4.16</b>	21	<b>5.16</b>	22
<b>TOTAL</b>	<b>291</b>	<b>TOTAL</b>	<b>318</b>	<b>TOTAL</b>	<b>335</b>	<b>TOTAL</b>	<b>321</b>	<b>5.17</b>	16
								<b>5.18</b>	18
								<b>5.19</b>	23
								<b>5.20</b>	20
								<b>5.21</b>	19
								<b>5.22</b>	15
								<b>5.23</b>	21
								<b>5.24</b>	20
								<b>5.25</b>	18
								<b>TOTAL</b>	<b>491</b>

Anexo 2. Continuación...

<b>PARTE SUPERIOR</b>									
<b>MUESTRA: ECM6</b>									
<b>FECHA:22-07-2015</b>									
<b>Cuadrante 1</b>		<b>Cuadrante 2</b>		<b>Cuadrante 3</b>		<b>Cuadrante 4</b>		<b>Cuadrante 5</b>	
<b>1.1</b>	17	<b>2.1</b>	14	<b>3.1</b>	13	<b>4.1</b>	17	<b>5.1</b>	8
<b>1.2</b>	19	<b>2.2</b>	10	<b>3.2</b>	9	<b>4.2</b>	15	<b>5.2</b>	10
<b>1.3</b>	13	<b>2.3</b>	17	<b>3.3</b>	5	<b>4.3</b>	10	<b>5.3</b>	8
<b>1.4</b>	21	<b>2.4</b>	12	<b>3.4</b>	15	<b>4.4</b>	14	<b>5.4</b>	13
<b>1.5</b>	11	<b>2.5</b>	9	<b>3.5</b>	19	<b>4.5</b>	9	<b>5.5</b>	15
<b>1.6</b>	18	<b>2.6</b>	15	<b>3.6</b>	11	<b>4.6</b>	11	<b>5.6</b>	12
<b>1.7</b>	20	<b>2.7</b>	18	<b>3.7</b>	17	<b>4.7</b>	13	<b>5.7</b>	11
<b>1.8</b>	15	<b>2.8</b>	11	<b>3.8</b>	10	<b>4.8</b>	10	<b>5.8</b>	9
<b>.9</b>	23	<b>2.9</b>	16	<b>3.9</b>	15	<b>4.9</b>	10	<b>5.9</b>	14
<b>1.10</b>	11	<b>2.10</b>	19	<b>3.10</b>	13	<b>4.10</b>	8	<b>5.10</b>	11
<b>1.11</b>	16	<b>2.11</b>	13	<b>3.11</b>	8	<b>4.11</b>	16	<b>5.11</b>	13
<b>1.12</b>	20	<b>2.12</b>	13	<b>3.12</b>	17	<b>4.12</b>	13	<b>5.12</b>	10
<b>1.13</b>	22	<b>2.13</b>	17	<b>3.13</b>	14	<b>4.13</b>	12	<b>5.13</b>	8
<b>1.14</b>	17	<b>2.14</b>	15	<b>3.14</b>	10	<b>4.14</b>	10	<b>5.14</b>	9
<b>1.15</b>	14	<b>2.15</b>	20	<b>3.15</b>	16	<b>4.15</b>	16	<b>5.15</b>	12
<b>1.16</b>	19	<b>2.16</b>	23	<b>3.16</b>	18	<b>4.16</b>	16	<b>5.16</b>	7
<b>TOTAL</b>	<b>276</b>	<b>TOTAL</b>	<b>232</b>	<b>TOTAL</b>	<b>210</b>	<b>TOTAL</b>	<b>200</b>	<b>5.17</b>	10
								<b>5.18</b>	14
								<b>5.19</b>	15
								<b>5.20</b>	9
								<b>5.21</b>	11
								<b>5.22</b>	13
								<b>5.23</b>	12
								<b>5.24</b>	9
								<b>5.25</b>	9
								<b>TOTAL</b>	<b>272</b>

**Anexo 3.** Evaluación de la Incidencia y Severidad de la Marchitez Vascular del Babaco, en la provincia de Loja.

Cantón	Lugar	Propietario	Grados de escala					Total de plantas evaluadas	Incidencia	Severidad	
			0	1	2	3	4				5
Saraguro	<b>Cochapamba</b>	Segundo Guayllas			900	1150	1350	4500	76	47	
	<b>Quisquinchir</b>	Simón Medina			250	200	150	200	1200	67	32
	<b>Las Lagunas</b>	Pedro Guaman	100			290	260	650	1500	87	53
	<b>Tuncarta</b>	Jorge Serrano	440	560	560	810	680	3050	100	45	
	<b>Chantaco</b>	Juan Cuenca	50				350	600	1250	80	55
	<b>El Carmelo</b>	Rosa Galvez			450	690	1250	2220	4610	100	63
<b>Loja</b>	<b>Reymincha</b>	Luz Tenesaca					100	150	250	100	72
	<b>Amable María</b>	Victor Flores				300	400	500	1200	100	63
	<b>El Alumbre</b>	Flor Torres					100	200	300	100	73

**Anexo 4.** Datos tomados de la Severidad de la enfermedad en el invernadero.

Tratamientos	Día 1	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20	Día 25	Día 30	Día 35	Día 40
T1	0.00	3.6	10.7	10.71	10.71	3.57	7.14	3.57	7.14
T1	3.57	3.6	10.7	10.71	10.71	7.14	7.14	3.57	7.14
T1	0.00	3.6	7.1	7.14	3.57	14.29	14.29	14.29	14.29
T1	7.14	3.6	3.6	3.57	3.57	10.71	14.29	14.29	14.29
T1	3.57	7.1	3.6	3.57	3.57	3.57	10.71	3.57	10.71
T1	3.57	7.1	3.6	3.57	7.14	3.57	3.57	3.57	7.14
T1	0.00	7.1	3.6	3.57	3.57	3.57	7.14	7.14	7.14
T2	0.00	3.6	7.1	7.14	7.14	3.57	7.14	3.57	7.14
T2	3.57	3.6	10.7	10.71	14.29	7.14	7.14	7.14	3.57
T2	3.57	3.6	7.1	7.14	7.14	7.14	10.71	10.71	10.71
T2	3.57	7.1	7.1	7.14	7.14	14.29	14.29	14.29	14.29
T2	3.57	7.1	3.6	3.57	3.57	3.57	10.71	10.71	10.71
T2	0.00	10.7	3.6	3.57	3.57	3.57	7.14	7.14	7.14
T2	0.00	7.1	3.6	3.57	7.14	3.57	7.14	7.14	10.71
T4	0.00	7.1	3.6	3.57	7.14	10.71	10.71	7.14	7.14
T4	3.57	10.7	7.1	7.14	10.71	7.14	7.14	3.57	10.71
T4	3.57	3.6	3.6	3.57	3.57	14.29	14.29	7.14	10.71
T4	3.57	3.6	14.3	10.71	3.57	10.71	10.71	10.71	14.29
T4	3.57	3.6	10.7	3.57	3.57	10.71	10.71	14.29	7.14
T4	3.57	7.1	10.7	10.71	7.14	7.14	7.14	3.57	7.14
T4	3.57	7.1	10.7	10.71	7.14	7.14	7.14	3.57	7.14
T5	0.00	3.6	3.6	3.57	3.57	10.71	10.71	7.14	7.14
T5	3.57	7.1	3.6	3.57	7.14	14.29	14.29	14.29	14.29
T5	3.57	3.6	3.6	3.57	3.57	14.29	14.29	14.29	14.29
T5	3.57	7.1	10.7	7.14	7.14	7.14	7.14	7.14	7.14
T5	3.57	3.6	14.3	7.14	3.57	10.71	10.71	14.29	14.29
T5	0.00	10.7	14.3	7.14	10.71	7.14	7.14	7.14	7.14
T5	0.00	7.1	3.6	3.57	7.14	3.57	3.57	3.57	7.14

**Anexo 5.** Análisis estadístico según Tukey 5% en el efecto de severidad de la enfermedad en los tratamientos T1, T2, T4 y T5, en las plantas de Babaco, bajo condiciones de invernadero. Loja. 2015.

<b>Tratamientos</b>	<b>sev1</b>	<b>sev5</b>	<b>sev10</b>	<b>sev15</b>	<b>sev20</b>	<b>sev25</b>	<b>sev30</b>	<b>sev35</b>	<b>sev40</b>
<b>1</b>	0.5	1.5	3.6	5.6	7.1 a	8.2a	8.7a	10.2a	10.7a
<b>2</b>	0.0	1.0	2.6	2.6	4.1b	5.1b	5.6ab	6.1b	7.1b
<b>4</b>	0.5	1.0	3.1	3.6	4.1b	4.6b	5.1b	6.1b	6.1b
<b>5</b>	0.5	1.0	2.0	3.1	3.6b	4.6b	4.6b	5.1b	5.1b

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, según Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

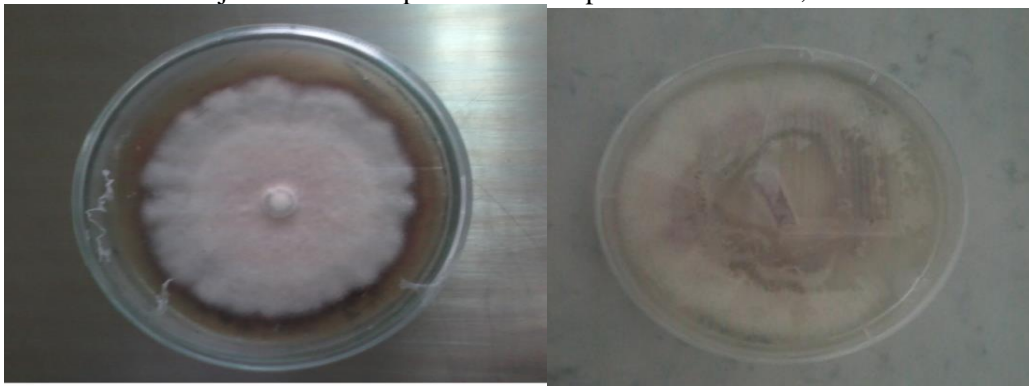
## Anexo 6. Fotografías.



**Anexo 6.1.** Evaluación de la incidencia y severidad de la MVB en la finca de la Sra. Rosa Galvez sector El Carmelo.

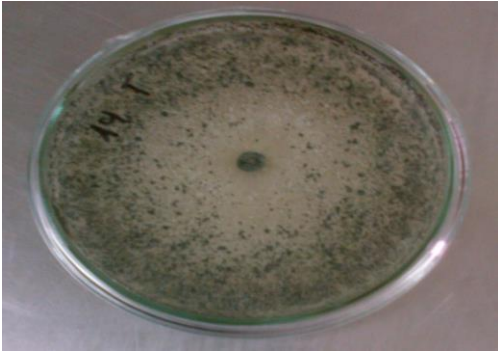


**Anexo 6.2.** Montaje del diseño experimental completamente al azar, en el invernadero.



**Anexo 6.3.** Cepas de *Fusarium oxysporum* QUI2 (izq) y CHA1 (der).





**Anexo 6.4** Cepa de *Trichoderma* spp.



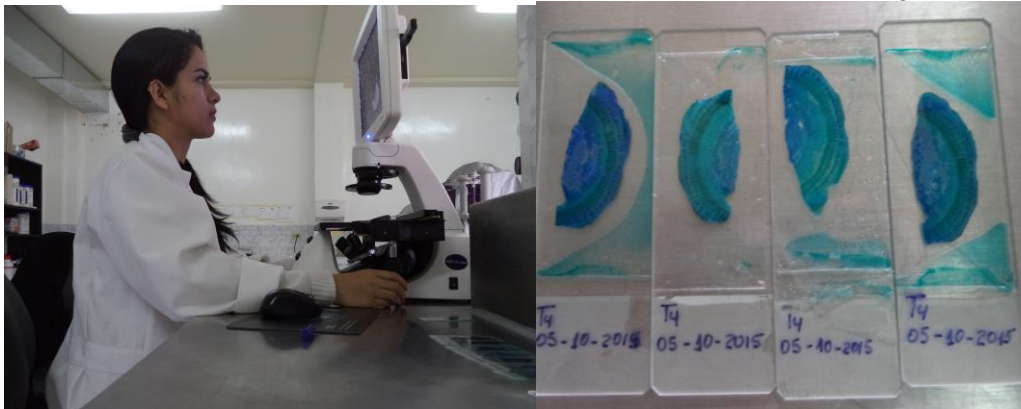
**Anexo 6.5.** Inoculación de las raíces de las plantas de Babaco con el hongo fitopatógeno mas el hongo biocontrolador.



**Anexo 6.6.** Base del cuello de la raíz de la planta de Babaco inoculado con *Fusarium oxysporum* QUI2.



**Anexo 6.7.** Cortes transversales de la base del cuello de la raíz de 10  $\mu$ m de grosor.



**Anexo 6.8.** Observaciones histológicas de los cortes realizados en el microscopio óptico OLYMPUS.